



| **UNR** Universidad  
Nacional de Rosario

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y  
FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas**

“Aplicación de reacciones en paralelo para la obtención  
de extractos modificados”

Presentada por:

**Pablo Emilio Santa Cruz**

Rosario, Argentina

**2018**

# **“Aplicación de reacciones en paralelo para la obtención de extractos modificados.”**

**Pablo Emilio Santa Cruz**

**Lic. en Química, Universidad Nacional de Rosario**

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Farmacognosia del Departamento de Química Orgánica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y en el Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario, dependiente de la Universidad Nacional de Rosario y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, durante el período comprendido entre Abril de 2014 y Marzo de 2018, bajo la dirección de la Dra. Andrea Marta Escalante y la co-dirección del Dr. Ricardo Luis Eugenio Furlán.



*“No puedo cambiar la dirección  
del viento, pero sí ajustar mis  
velas para llegar siempre a mi  
destino.”*

*James Byron Dean*



## AGRADECIMIENTOS

*Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su soporte científico y humano han colaborado en la realización de este trabajo de investigación.*

*En primer lugar, quiero agradecer a mi directora la Dra. Andrea Marta Escalante por su presencia incondicional, sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación, y más aún por la paciencia. A mi co-director el Dr. Ricardo Luis Eugenio Furlan por su constante y paciente seguimiento y asistencia, compartiendo sus conocimientos y su tiempo de manera generosa durante el desarrollo del presente trabajo.*

*Gracias a mis padres y a mi hermana Luli por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas. Por desear y anhelar siempre lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida.*

*A mis abuelas, tíos y tías, primos y primas, madrina que, durante el desarrollo y la realización de esta tesis, fueron un pilar muy importante, tanto en inspiración como en fuerza para cada día despertarme con ganas de alcanzar el éxito y luchar por cada uno de mis metas, sueños y anhelos.*

*A mis amigas y compañeras de trabajo, Agus, Aye, Pau, Noe, Jou que siempre me apoyaron en este camino, me contuvieron en varias oportunidades y me alentaron a seguir adelante, teniendo siempre las palabras justas, simplemente gracias.*

*A mis amigos de la vida, Geor, Fla, Juli, Juampi, Romy, Vir, Ro, Cris, Mauri, Flora, Ide por compartir tantos años y entender mis muchas ausencias durante esta etapa. Gracias por las reuniones de risas y complicidades, y por la incondicionalidad y el aguante.*

*A mis compañeros de la carrera y amigos Nanu, Maite, Denis, Salva, Pame por los buenos momentos que hemos compartido. Creo que todos hemos aprendido y aprendemos continuamente de todos y de nosotros mismos, tanto profesional como personalmente. Y eso es enriquecedor en ambos ámbitos, en especial un cariñoso reconocimiento a los que me han demostrado su apoyo y brindado sus ánimos y consejos durante esta etapa.*

*A mis compañeros de trabajo, Mai, Liz, Charlero, Gasti, Marito, Rochi por compartir sus conocimientos conmigo. Les agradezco a ellos y a todos los amigos de Farmacognosia e IIDEFAR Marquitos, Maxi, Lau, Estefi, Agus, Marce, Meli B, Meli D, Tana, Susi, Iña, Lore, Dani, Flor, Yas, por su generosidad, su solidaridad, calidez y los buenos momentos compartidos.*

*A la Dra. Victoria Alonso por los ensayos de inhibición en bromodominios y por la contención y buena onda de siempre.*

*A las Dras. Silvia N. López y María Victoria Castelli por depositar su valioso tiempo en alguna que otra oportunidad, gracias por su ayuda, buena predisposición y contención.*

*A la Dra. Patricia C. Damiani por la contención de siempre y por las palabras de aliento en pos de seguir en el proyecto de Tesis.*

*A la Dra. Susana A. S. Zacchino por permitirme utilizar parte del espacio necesario para poder desarrollar mi trabajo de tesis y por el buen trato siempre.*

*A Sergio Tindiglia, Pablo Duché y Fernanda Villalonga por las herramientas espectroscópicas de RMN brindadas.*

*Al Dr. Claudio Fernández y al personal del Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario por permitirme el acceso a equipos e instalaciones.*

*A las entidades que permitieron con su apoyo edilicio y/o financiero que este trabajo fuera llevado a cabo: UNR, ANPCyT y CONICET.*

*A TODOS los que no menciono, pero que desde el lugar que ocuparon y ocupan en mi vida, contribuyeron a que esté hoy en este lugar.*





Este trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

## **PUBLICACIONES**

GARCÍA, STELLA M.; ROTONDO, ROSANA; LÓPEZ ANIDO, F.S.; COINTRY, E.L.; **SANTA CRUZ, P.**; FURLÁN, RICARDO L.E.; ESCALANTE, ANDREA M. Influence of Irrigation on The Chemicals Compounds in Leaves in Vegetative and Reproductive Stage and Bracts of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) *ACTA HORTICULTURAE*; Año: 2016 p. 95 – 102.

GARCÍA, STELLA M.; ROTONDO, ROSANA; LÓPEZ ANIDO, F.S.; COINTRY, E.L.; **SANTA CRUZ, P.**; FURLÁN, RICARDO L.E.; ESCALANTE, ANDREA M. Effect of Gibberellic Acid Application on The Content of Active Compounds in Leaves and Bracts of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.). *ACTA HORTICULTURAE*; Año: 2016 p. 103 – 112.

## **PRESENTACIÓN A REUNIONES CIENTÍFICAS**

“Caracterización química de extractos de alcachofa por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas”. Presentado bajo la modalidad de póster en “II CONGRESO ARGENTINO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS”. Córdoba, Argentina, 09/11/2014.

“Effect of Gibberellic Acid Application on The Content of Active Compounds in Leaves and Bracts of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.)”. Presentado bajo la modalidad de poster en “IX Simposio Internacional de la Alcachofa, Cardo y sus variantes silvestres”, La Plata, Argentina, 02/10/2015.

“Influence of Irrigation on The Chemicals Compounds in Leaves in Vegetative and Reproductive Stage and Bracts of Globe Artichoke (*Cynara*

*cardunculus* var. *scolymus* L.)". Presentado bajo la modalidad de póster en "IX Simposio Internacional de la Alcachofa, Cardo y sus variantes silvestres", La Plata, Argentina, 02/10/2015.

"Actividad inhibitoria sobre tirosinasa tras modificación química de extractos naturales". Presentado bajo la modalidad de póster en "XX Simposio Nacional de Química Orgánica", Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica, Mar del Plata, Argentina, 14/11/2015.

"Generación de inhibidores de la enzima tirosinasa por modificación química de extractos de alcachofa". Participación en carácter de expositor en "X Jornada de Ciencia y Tecnología, divulgación de la producción científica y tecnológica de la UNR", Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNR, Rosario, Argentina, 26/10/2016.

"Identificación de diacetil hidrazida como un inesperado inhibidor de la enzima tirosinasa". Presentado bajo la modalidad de póster en "XXI Simposio Nacional de Química Orgánica", Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica, San Luis, Argentina, 08/11/2017.







# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>v</b>
<b>PUBLICACIONES .....</b>	<b>viii</b>
<b>PRESENTACIÓN A REUNIONES CIENTÍFICAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
1.1. Modificación química de extractos naturales como estrategia de diversificación molecular .....	12
1.2. Reacciones de diversificación química .....	15
1.2.1. Halogenación con Bromo.....	15
1.2.2. Sulfonilación.....	15
1.2.3. Hidracinólisis .....	16
1.3. Especies vegetales de uso medicinal como plataformas para diversificación molecular dirigida.....	17
1.4. Análisis del impacto de las reacciones de modificación en extractos vegetales.....	21
1.4.1. Comparación de los perfiles químicos de los extractos naturales y modificados .....	21
1.4.2. Comparación de los perfiles de actividad de los extractos naturales y modificados .....	22
1.4.3. Propiedades biomoleculares de los extractos naturales y modificados .....	24
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
2.1 Objetivos generales.....	33
2.2 Objetivos específicos .....	33
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
CAPÍTULO I .....	37
1.1 Preparación y selección de extractos naturales a modificar .....	38
1.2 Modificación química de extractos seleccionados .....	43
1.3 Análisis del impacto de la modificación en la composición química de los extractos .....	47
1.3.1 Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) .....	47

1.4 Comparación de la actividad captadora de radicales DPPH de extractos naturales vs modificados con hidracina monohidrato .....	51
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>55</b>
2.1 Análisis del impacto de la modificación química en las propiedades biomoleculares de los extractos .....	56
2.1.1 Actividad inhibitoria frente a $\beta$ -glucosidasa .....	56
2.1.2 Actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa.....	57
2.1.3 Actividad inhibitoria frente a la enzima xantina oxidasa.....	58
2.1.4 Actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa.....	59
2.2 Aislamiento bioguiado de compuestos activos (Protocolo I) .....	61
2.2.1. Elucidación estructural del primer compuesto aislado activo .....	63
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>69</b>
3.1 Búsqueda de compuestos activos en los extractos modificados con hidracina monohidrato (Protocolo II).....	70
3.2 Modificación química del ácido clorogénico.....	73
3.2.1. Aislamiento y purificación de los compuestos activos provenientes de la modificación de ácido clorogénico con hidracina monohidrato.....	74
3.2.2. Generación de una potencial pirazolidinona y otros derivados a partir de la modificación química de ácido clorogénico con hidracina monohidrato .....	79
3.2.3 Síntesis de cafeoato de metilo y posterior modificación química con hidracina monohidrato .....	81
3.2.4. Escalado de la modificación química de cafeoato de metilo y purificación de los activos mediante HPLC preparativo .....	92
3.2.5. Purificación de activos por HPTLC e interfaz de EM.....	93
3.3 Estudio de otros componentes de <i>C. scolymus</i> .....	96
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>98</b>
4.1 Actividad de extractos modificados en bromodominios de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	99
4.2 Resultados obtenidos para extractos modificados por sulfonilación, bromación e hidracinólisis. ....	100
4.2.1. Modificación química de Silimarinas y Taxifolina con bromo .....	104
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>109</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>116</b>
5.1 Equipamientos y reactivos.....	118
5.2 Material vegetal utilizado .....	119
5.3 Preparación de los extractos nativos .....	119

5.4 Generación de extractos modificados.....	120
5.4.1 Reacción de bromación.....	120
5.4.2 Reacción de sulfonilación .....	120
5.4.3 Reacción de hidracinólisis .....	121
<b>Protocolo I</b> .....	121
5.5 Ensayo de actividad antioxidante utilizando DPPH.....	121
5.6 Comparación de cambios en las propiedades biomoleculares de los extractos .....	122
5.6.1 Actividad inhibitoria $\beta$ -glucosidasa .....	122
5.6.2 Actividad inhibitoria acetilcolinesterasa .....	122
5.6.3 Actividad inhibitoria de xantina oxidasa.....	123
5.6.4 Actividad inhibitoria de tirosinasa .....	124
5.7 Reacción de AcOEt con hidracina monohidrato .....	125
5.8 Determinación de $Cl_{50}$ de compuestos inhibidores de tirosinasa .....	125
5.9 Reacción de modificación química del ácido clorogénico con hidracina monohidrato .....	126
5.9.1 Fraccionamiento del clorogénico modificado f. BuOH que resultó activa frente a tirosinasa.....	126
5.9.2 Escalado de la reacción de modificación química del ácido clorogénico con hidracina monohidrato.....	127
5.9.3 Nuevas condiciones para el fraccionamiento del clorogénico modificado f. BuOH que resultó activa frente a tirosinasa.....	127
5.9.4 Reacción de modificación química del ácido clorogénico con hidracina monohidrato  escalado nuevo .....	127
5.9.5 Fraccionamiento del clorogénico modificado f. BuOH que resultó activa frente a tirosinasa.....	128
5.10 Síntesis de cafeoato de metilo.....	128
5.10.1 Modificación química de cafeoato de metilo con hidracina monohidrato .....	128
5.11 Condiciones e instrumental para experimento de CLAE.....	128
5.12 Condiciones para experimento de CLAE-EM .....	129
5.13 Escalado y purificación de los activos mediante HPTLC e interfaz de EM .....	129
5.14 Determinación de $Cl_{50}$ de compuestos inhibidores de tirosinasa .....	129
5.15 Reacción de Rutina y Luteolina con hidracina monohidrato .....	130
5.16 Ensayo de inhibición de bromodominios de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	130
5.16.1 Ensayo en microplaca .....	130



5.16.2 Ensayo en epimastigotes (curva de crecimiento) .....	131
5.17 Reacción de Silimarinas con bromo .....	131
5.17.1 Fraccionamiento de Silimarinas modificadas con bromo que resultaron activas frente a inhibición de bromodominios de <i>T. cruzi</i> .....	132
5.18 Reacción de Taxifolina con bromo.....	132
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>134</b>







## **ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

AcOEt: Acetato de etilo

Ach: Acetilcolina

AchE: Acetilcolinesterasa

BDPNB: Base de Datos de Productos Naturales Bioactivos

BuOH: Butanol

CAM: Cafeoato de metilo

CAMM: Cafeoato de metilo modificado

CC: Cromatografía en columna

CCD: Cromatografía en capa delgada

CDCl<sub>3</sub>: Cloroformo deuterado

CHCl<sub>3</sub>: Cloroformo

Cl<sub>50</sub>: Concentración de analito que inhibe el 50 por ciento de la actividad enzimática

CLAE-EM: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masa

DAH: Diacetil hidrazida

DCM: Diclorometano

DCQs: Dicafeilquínicos

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EM: Espectrometría de Masa

EPM: Extracto de Partida obtenido por Maceración

EPR: Extracto de Partida obtenido por calentamiento a Reflujo

EtOH: Etanol

Hex: Hexano

IR: Espectroscopía en el Infrarrojo

meq: miliequivalente/s

MeOH: Metanol

MCQs: Monocafeilquínicos

m/z: Relación masa-carga

NBT: Nitro Blue Tetrazoilo

N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O: Hidracina monohidrato

PM: Peso Molecular

PMP: Peso Molecular Promedio

PPO: Polifenol Oxidasa

PNs: Productos Naturales

Rf: Relación de frente

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

TcBDF3: Factor con Bromodominio 3 en *Trypanosoma Cruzi*

TsCl: Cloruro de *p*-toluen sulfonilo

TDV: Tiempo De Vuelo

TEMED: N,N,N'N'-Tetrametiletilendiamina

TFA: Ácido trifluoroacético

tR: tiempo de Retención

U: Unidad de actividad enzimática

UV: luz Ultravioleta

XO: Xantina Oxidasa

## RESUMEN

El acceso a bibliotecas de compuestos con propiedades biomoleculares interesantes es una etapa limitante en el proceso de descubrimiento de drogas. Los productos naturales (PNs) han sido muy valiosos como plataformas validadas biológicamente por contener esqueletos moleculares que presentan dichas cualidades. En una serie de artículos de revisión, Newman, Craig y colegas, han analizado las fuentes de drogas demostrando la valiosa y continua contribución de las plataformas naturales como fuente de compuestos líderes que han servido de inspiración para la síntesis de nuevas drogas. De los nuevos medicamentos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (*FDA*, del inglés *Food and Drug Administration*) entre 1981-2010, el 34 % estaban basados en moléculas pequeñas de PNs o derivados directos de los mismos, incluyendo las estatinas, diferentes medicamentos contra el cáncer y algunos inmunosupresores.

La preparación de extractos modificados (EMs) a través de diversificación química dirigida representa una forma alternativa e interesante de usar esqueletos naturales conocidos y desconocidos como material de partida para la generación de bibliotecas semisintéticas de compuestos con propiedades biológicas de interés. La clave para lograr la alteración de una proporción significativa de los componentes de una mezcla compleja yace en la selección de potenciales grupos reactivos que puedan ser encontrados en la mayoría de las pequeñas moléculas presentes en PNs e introducir nuevas funcionalidades potencialmente activas en propiedades de reconocimiento molecular. La hipótesis postulada en mi trabajo de tesis plantea la utilización de secuencias de reacciones dirigidas a transformar grupos funcionales de alta presencia en compuestos de plantas medicinales lo cual permitiría incorporar nuevos fragmentos relevantes como farmacóforos y diversificar las propiedades biomoleculares de sus componentes.



Las modificaciones químicas en PNs están dirigidas al desarrollo de funcionalidades atípicamente encontradas en derivados de origen natural a través de reacciones destinadas a transformar grupos funcionales (GF) de alta presencia en PNs tales como dobles enlaces, anillos aromáticos, carbonilos, aminas y alcoholes.

La incorporación de átomos de halógeno es una estrategia común para modificar moléculas con el objeto de alterar sus bioactividades y especificidades. Diferentes estudios demuestran que la proporción de halógenos en drogas es significativamente mayor que en productos naturales. Dentro de los metabolitos secundarios halogenados, aquellos que contienen bromo se encuentran en el segundo lugar en abundancia, luego de los clorados. Estos metabolitos son mayoritariamente producidos por organismos marinos (algas, esponjas, corales, moluscos, etc.), a partir de los cuales se han aislado varios metabolitos con actividad antibacteriana, antitumoral, antiviral y antifúngica. En contraste, las plantas terrestres raramente contienen compuestos bromados por lo que consideramos interesante realizar la bromación de esqueletos naturales presentes en extractos de plantas no marinas y analizar el efecto de este proceso sobre las propiedades biomoleculares de las mezclas.

El contenido de azufre de los productos naturales extraídos de plantas es inferior al contenido observado en otras de fuentes de origen natural. De los 6.629 compuestos de origen vegetal reportados en la Base de Datos de Productos Naturales Bioactivos (*BDPNB*), sólo un 2,1 % incorporan azufre en sus estructuras. Los GF azufrados presentes en productos naturales son variados. Entre ellos se encuentran tioles, sulfuros, disulfuros, tiosulfonatos, tiosulfinatos, sulfóxidos, sulfonas, isotiocianatos, polisulfuros, ácidos sulfínicos y sulfénicos. La baja cantidad de compuestos azufrados encontrados en plantas, la relativamente baja diversidad de GF encontrados dentro de ellos y las importantes actividades biológicas que muestran, hacen interesante la introducción de este elemento en productos naturales de origen vegetal.

Si bien los grupos nitrogenados se encuentran presentes en una buena cantidad de productos naturales, su abundancia es inferior a la observada en poblaciones de moléculas empleadas como drogas. Dentro de los grupos nitrogenados presentes en productos naturales, aquellos que contienen dos átomos de nitrógeno adyacentes representan una porción minoritaria. Específicamente, las moléculas que contienen hidracinas, hidrazidas o hidrazonas sólo representan, de acuerdo a un análisis estadístico, el 0,7% del total de metabolitos secundarios. Todo esto convierte al grupo N-N en un fragmento interesante a ser introducido en esqueletos de productos naturales. La modificación de grupos C=O, presentes en más del 70% de los PNs, ofrece el acceso óptimo para la incorporación de N a través del empleo de hidracina.

La alta diversidad química de las moléculas presentes en extractos de PNs vegetales y el hecho de desconocer las composiciones químicas de estas mezclas sumado al cambio estructural que se produce al modificarlas, hace que el análisis de los extractos de partida y modificados resulte un desafío. Por este motivo, tanto el seguimiento de las reacciones como el monitoreo de su efecto sobre las propiedades de las mezclas se efectúa por comparación de sus (1) perfiles químicos y (2) perfiles de bioactividad.

1) Los perfiles químicos tienen como objeto intentar estimar el éxito de la reacción y su impacto en la composición. Con “éxito de la reacción” nos referimos a observar cambios en propiedades relacionadas a los GF de alta presencia o a GF que se desean introducir en la mezcla. Con “impacto en la composición” nos referimos al grado en que la composición química es alterada por la reacción. Dentro de las técnicas analíticas útiles para establecer perfiles y analizar la composición de mezclas complejas como son los extractos vegetales, pueden considerarse a las cromatográficas, espectrométricas y a sus combinaciones como las más relevantes. Dentro de las técnicas cromatográficas, la cromatografía líquida asociada a espectrometría de masa (CL-EM) es una técnica muy usada para el análisis de mezclas complejas de origen natural que se ha impuesto como una combinación robusta que permite la identificación de cientos de

metabolitos en mezcla. El acoplamiento de técnicas de separación cromatográfica como CL a analizadores de masa permite una correcta deconvolución de los picos de mezclas complejas debido a la alta velocidad de escaneo que presentan estos instrumentos. El impacto en la composición de los extractos fue estudiado utilizando CL-EM además de cromatografía en capa delgada (CCD) aplicando diferentes reveladores, entre ellos 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH).

2) La comparación de perfiles de bioactividad entre extractos de partida y EMs se realizó a través de ensayos autográficos. Dado que los métodos autográficos combinan la capacidad separativa de la cromatografía en capa delgada con la determinación *in situ* de la actividad biológica de los componentes de una mezcla, en conjunto permiten preasignar de manera cualitativa bioactividad sobre uno o más componentes de la misma. Se utilizaron ensayos autográficos previamente desarrollados y descritos por nuestro grupo para detectar inhibidores de acetilcolinesterasa, xantina oxidasa,  $\beta$ -glucosidasa y tirosinasa. Además, con el objeto de analizar el efecto de la modificación química frente a nuevas propiedades biomoleculares, se aplicó el ensayo que permite detectar inhibidores del Bromodominio Funcional 3 de *Trypanosoma cruzi* (TcBDF3), el cual juega un papel muy importante como potencial blanco terapéutico contra la enfermedad de Chagas. Este último estudio se hizo en colaboración con el grupo del Dr. Esteban Serra.

En principio se prepararon extractos provenientes de plantas medicinales (*Cynara scolymus*, *Peumus boldus*, *Arctium lappa* y *Silybum marianum*) utilizando dos metodologías: extracción por calentamiento a reflujo y maceración. Los dos tipos de extracciones se realizaron con el fin de observar si se producía alguna diferencia en la composición química de los extractos obtenidos a partir de la aplicación de cada una de las mencionadas técnicas extractivas. En particular, sobre el material utilizado de la especie *S. marianum* se aplicó previamente extracción por Soxhlet utilizando hexano como solvente, debido a que la droga vegetal posee un alto contenido de grasas. Una vez preparados todos los extractos, se analizaron cualitativamente sus composiciones químicas. Para ello, se

utilizaron CCD y CL-EM. Los extractos de *C. scolymus* y *S. marianum* obtenidos por maceración y por reflujo mostraron perfiles cromatográficos diferentes, por lo cual todos los extractos provenientes de estas dos especies fueron seleccionados para modificación química. En cambio, los de *A. lappa* y *P. boldus* obtenidos por maceración y calentamiento a reflujo mostraron perfiles cromatográficos muy similares y por ello sólo los extractos macerados fueron seleccionados para su posterior modificación química.

En paralelo, se modificaron 7 extractos nativos (de *C. scolymus* obtenidos por maceración y calentamiento a reflujo; de *S. marianum* obtenidos por *Sohxlet*, maceración y calentamiento a reflujo; de *P. boldus* y *A. lappa* obtenidos por maceración), aplicando reacciones de bromación, sulfonilación o hidracinólisis, utilizando como reactivos bromo, cloruro de *p*-toluen sulfonilo o hidracina monohidrato ( $N_2H_4 \cdot H_2O$ ), respectivamente. Se obtuvieron en total 42 extractos modificados a partir de los 7 extractos de partida. El éxito de las reacciones de modificación se estudió utilizando CCD y CL-EM, a través de cambios detectados en extractos modificados vs. extractos de partida.

El impacto de la modificación química sobre la composición de los extractos fue evaluado inicialmente por CCD utilizando diversos reveladores. Interesantemente, tras la reacción de hidracinólisis, se observó la presencia de nuevos compuestos captadores de radicales DPPH en el cromatograma de los extractos modificados de *A. lappa*, *P. boldus*, *C. scolymus* y *S. marianum*. Este resultado nos llevó a sugerir que la reacción de modificación con hidracina daba lugar a la formación de nuevos compuestos los cuales podrían contener en su estructura porciones provenientes de  $N_2H_4 \cdot H_2O$ .

Por otro lado, el efecto de la modificación química de los extractos sobre las propiedades biomoleculares fue evaluado por medio de cuatro ensayos bioautográficos que permiten detectar inhibidores de las enzimas  $\beta$ -glucosidasa, acetilcolinesterasa, xantina oxidasa y tirosinasa. La falta de actividad inhibitoria de todas las mezclas (naturales y semisintéticas) frente a las tres primeras enzimas nos permitió concluir que para este grupo de

extractos sus propiedades biomoleculares no cambian tras las reacciones aplicadas o bien los cambios no son detectables bajo las condiciones experimentales empleadas. Sin embargo, los resultados frente a tirosinasa mostraron cambios de bioactividad en los extractos de *C. scolymus* modificados con  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , no resultando así para el conjunto los demás extractos.

La comparación de perfiles de CL-EM de los extractos de *C. scolymus*, de partida y modificados con  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , permitió visualizar cambios significativos en la composición. Uno de los cambios definidos fue la desaparición del pico correspondiente a un compuesto en particular, ácido clorogénico, presente en el extracto de partida y ausente en el extracto modificado de *C. scolymus*. Dada la actividad frente a tirosinasa hallada en los extractos de esta especie modificados con  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , planteamos como probabilidad que la misma podría surgir de la generación de compuestos provenientes de la modificación del ácido clorogénico (mono-cafeoilquínico) con  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ . Este metabolito se encuentra descrito en la droga vegetal de la especie y puro resultó inactivo frente a tirosinasa al igual que los extractos de partida de *C. scolymus*.

La purificación por cromatografía en columna (CC) del extracto modificado y el posterior análisis de los espectros de RMN y EM de las fracciones purificadas activas, permitieron detectar la presencia de una tentativa pirazolidinona producto de la reacción entre el ácido clorogénico e  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ .

Se modificó químicamente ácido clorogénico puro con  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  siguiendo las mismas condiciones de reacción aplicadas en los extractos, las cuales fueron luego optimizadas. La optimización muestra que la cantidad de  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  utilizada durante la reacción de modificación es clave para la generación de los productos modificados que resultan activos frente a tirosinasa. Paralelamente, se modificó cafeoato de metilo (contiene la porción cafeoil presente en el ácido clorogénico) con  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  y el producto obtenido mostró el mismo perfil de actividad tirosinasa que el encontrado para los productos del clorogénico modificado con  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ . Con experimentos de CLAE-EM se detectaron masas coincidentes con las

correspondientes a cafeoilpirazolidinona y cafeoilhidrazida potencialmente resultantes de la hidracinólisis del cafeoato de metilo.

Se escaló la reacción de modificación de cafeoato de metilo con  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y se obtuvo una mezcla de compuestos activos que al intentar ser purificada y sus fracciones caracterizadas por RMN y CLAE-EM, nuevamente mostraron la posible pirazolidinona y la acilhidrazida anteriormente mencionadas en mezcla. Se planificaron y realizaron sucesivas purificaciones mediante CC en fase normal y también por CLAE preparativo en fase reversa con previa optimización del método por CLAE analítico. Aun así, no se lograron separar totalmente los compuestos propuestos. A partir de los resultados alcanzados se plantearon posibles mecanismos de reacción de la porción cafeoil del ácido clorogénico con  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  que podrían dar lugar a los potenciales productos de reacción antes descritos.

Se modificaron además con  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  otros componentes de *C. scolymus* como rutina y luteolina. No se detectó actividad frente a la enzima tirosinasa luego del lavado de la reacción y sin mayor grado de purificación.

Se halló un compuesto ubicuo, el cual se genera a partir de la reacción entre acetato de etilo ( $\text{AcOEt}$ ) e  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  durante el lavado de la reacción, motivo por el cual se modificó el protocolo de la reacción de hidracinólisis obviando lavados con  $\text{AcOEt}$ . En relación a este compuesto ubicuo se caracterizó haciendo experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , EM y espectroscopía IR. Todo esto condujo a que dicho compuesto es la diacetil hidrazida. La misma resultó activa frente a la enzima tirosinasa y no tiene citotoxicidad reportada. Diacetil hidrazida presentó una concentración que inhibe el 50% de la actividad enzimática ( $\text{CI}_{50}$ ) en  $7.59 \pm 0.75 \mu\text{M}$ , siendo 1,56 veces más activo que el inhibidor de referencia ácido kójico ( $\text{CI}_{50} = 11.97 \pm 0.75 \mu\text{M}$ ). Se evaluó además su citotoxicidad empleando líneas celulares VERO encontrando que hasta  $200 \mu\text{M}$  no es citotóxico. Este experimento fue realizado en colaboración con el grupo del Dr. Esteban Serra.

Con el objeto de analizar el efecto de la modificación química de los extractos sobre otras propiedades biomoleculares se aplicó un nuevo ensayo que permite detectar inhibidores del bromodominio TcBDF3. En cuanto a este ensayo biológico se halló actividad sobre el extracto de *S. marianum* bromado. Una de las subfracciones obtenidas, luego de realizar purificación por CC, recupera la actividad del extracto total. Se trabajó luego, con los componentes mayoritarios reportados para dicho extracto, que son el grupo de las silimarinas y taxifolina. Ambos se modificaron con bromo, resultando activa una fracción de purificación proveniente del grupo de las silimarinas bromadas, con una actividad del orden de la del inhibidor de bromodominios iBET-151. El ensayo de inhibición con proporciones en que el grupo de las silimarinas y taxifolina se hallan en el extracto (20:1, respectivamente), utilizando silimarina y taxifolina modificadas con bromo, indicó que la mezcla (20:1) es activa, pero en menor proporción que iBET-151. Esto sugiere que el grupo de las silimarinas bromadas sería responsable de la actividad.









# 1. INTRODUCCIÓN







### 1.1. Modificación química de extractos naturales como estrategia de diversificación molecular

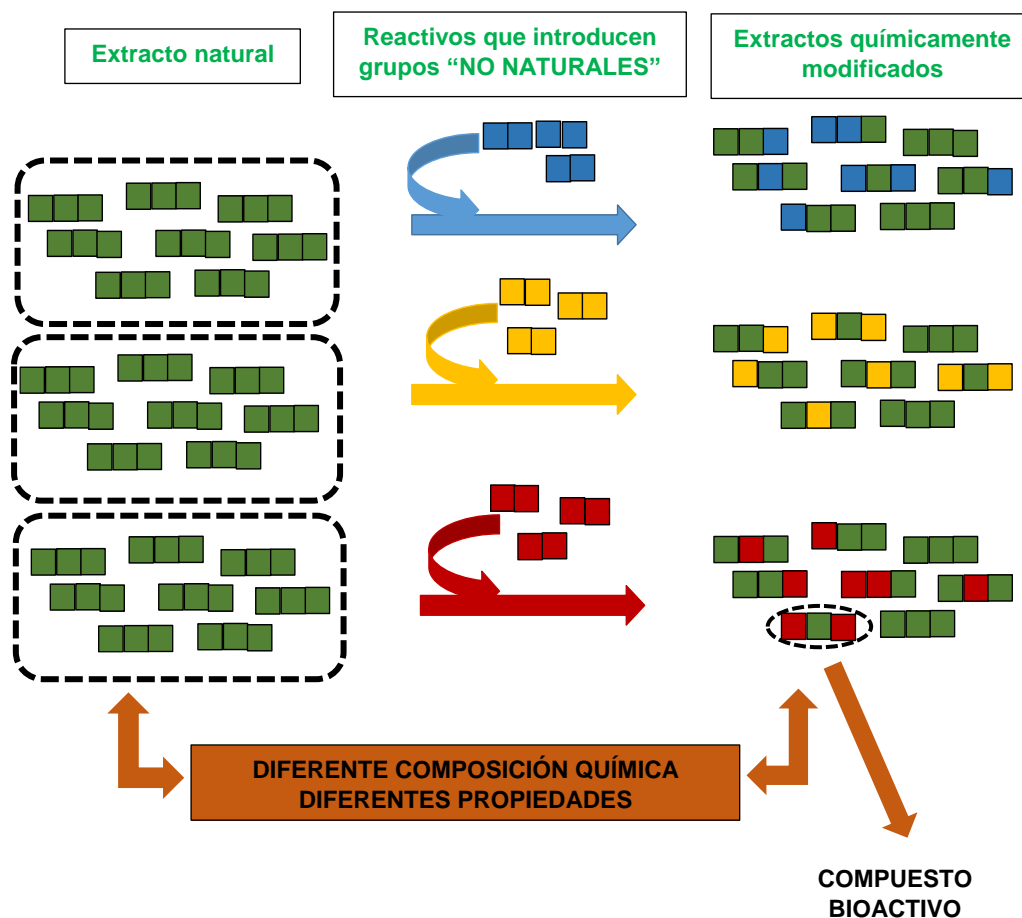
El acceso a bibliotecas de compuestos con propiedades biomoleculares interesantes es una etapa limitante en el proceso de descubrimiento de drogas. Los productos naturales (PNs) han sido muy valiosos como plataformas validadas biológicamente por contener esqueletos moleculares que presentan dichas cualidades.<sup>1,2</sup> En una serie de artículos de revisión, Newman, Craig y colegas,<sup>3,4</sup> han analizado las fuentes de drogas de los últimos 35 años. Este análisis demostró la valiosa y continua contribución de los PNs como fuente de compuestos líderes que han servido de inspiración para la síntesis de nuevas drogas.<sup>5,6</sup>

De los nuevos medicamentos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*), entre 1940 a 2014 dentro del área de cáncer se aprobaron 175 pequeñas moléculas, 85 de las cuales (49%) correspondían a PNs o derivados directos de los mismos.<sup>3,7,8</sup>

Sin lugar a dudas el éxito de los PNs radica en que son compuestos cuyas estructuras ya han sido validadas evolutivamente, han sido biosintetizados, degradados y transformados por sistemas enzimáticos. Por lo tanto, a la hora de interactuar con moléculas biológicas blanco lo realizarán de una manera privilegiada.<sup>9,10</sup>

En la literatura hay una serie de ejemplos que muestran cómo la formación de artefactos producidos por solventes genera cambios en la bioactividad de moléculas naturales en forma positiva o negativa.<sup>11</sup> De la misma manera, la modificación química dirigida de componentes de un extracto natural puede alterar las propiedades biomoleculares de los mismos.

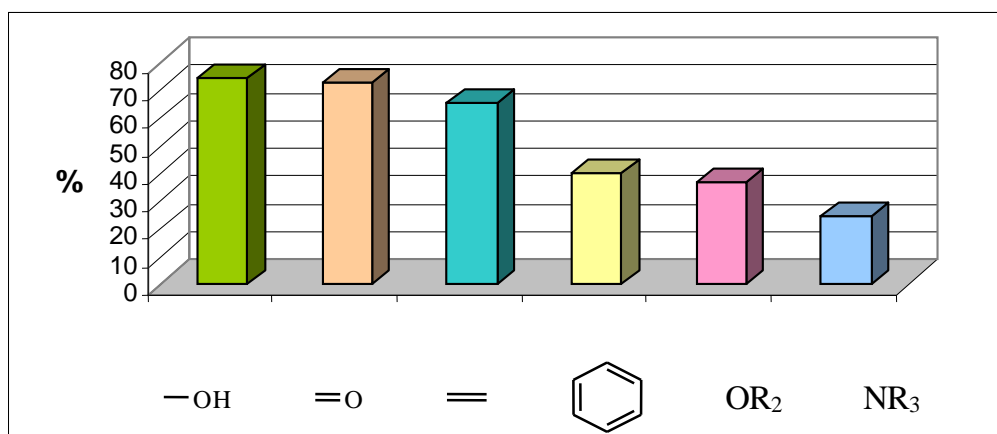
La preparación de extractos modificados a través de la diversificación química dirigida representa una forma alternativa de usar esqueletos naturales conocidos y desconocidos como material de partida para la generación de bibliotecas semisintéticas de compuestos (**Figura 1**).<sup>12</sup>



**Figura 1:** Diversificación química de mezclas complejas naturales, aplicando reacciones químicas en paralelo, como fuente de nuevos compuestos bioactivos.

La clave para lograr la alteración de una proporción significativa de los componentes de un extracto proveniente de una fuente natural yace en la selección de potenciales grupos reactivos que puedan ser encontrados en la mayoría de las pequeñas moléculas presentes en los PNs. Para conocer cuáles son los fragmentos reactivos que los PNs contienen en abundancia, nuestro grupo realizó una búsqueda en bases de datos de los grupos funcionales más altamente frecuentes en PNs,<sup>13</sup> encontrando que alrededor del 75 % de sus moléculas posee al menos un grupo hidroxilo y una similar proporción posee grupos carbonilo o un doble enlace. En menor proporción los productos naturales también contienen anillos aromáticos y fragmentos nitrogenados (**Figura 2**).





**Figura 2:** Porcentaje de productos naturales que contienen diferentes grupos funcionales mayoritarios.

Teniendo en claro cuáles son los fragmentos reactivos presentes en alta proporción de PNs, la implementación de la estrategia de diversificación molecular en ellos requiere de la combinación de i) reacciones químicas apropiadas para generar extractos modificados, ii) métodos adecuados para el análisis de la composición de mezclas y iii) ensayos adecuados para el análisis de la actividad biológica.

Recientemente, reacciones de hidracinólisis,<sup>14,15</sup> sulfonilación,<sup>16</sup> bromación,<sup>17</sup> etanólisis<sup>18</sup>, epoxidación<sup>19</sup> y con clorhidrato de hidroxilamina<sup>20</sup> han sido aplicadas a extractos de plantas para obtener nuevos compuestos bioactivos. Utilizando las mencionadas reacciones se incorporaron átomos de nitrógeno a través de grupos carbonilo, azufre por transformación de hidroxilos y aminas, bromo por reacción sobre dobles enlaces y anillos aromáticos.<sup>12</sup> La incorporación de átomos de nitrógeno a través de reacción con hidracina ha llevado al aislamiento de pirazoles con actividad antifúngica<sup>14</sup> y con actividad inhibidora de la agregación del péptido A $\beta$ .<sup>15</sup> La incorporación de átomos de azufre mediante reacción con cloruros de arilsulfonilo ha llevado al aislamiento de un derivado de histamina inhibidor de  $\beta$ -glucosidasa.<sup>21</sup> La modificación química de extractos por incorporación de bromo ha llevado al aislamiento de un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa,<sup>17</sup> así como también inhibidores de la enzima xantina oxidasa.<sup>22</sup>

## 1.2. Reacciones de diversificación química

### 1.2.1. Halogenación con Bromo

A lo largo de los últimos años, PNs marinos han demostrado ser fuentes importantes de metabolitos halogenados.<sup>23-26</sup> Varios metabolitos organobromados con actividad antibacteriana,<sup>27</sup> antitumoral,<sup>28</sup> antiviral<sup>29</sup> y antifúngica<sup>30</sup> han sido aislados de corales, moluscos, algas y esponjas marinas, entre otros. Sin embargo, sólo unos pocos compuestos conteniendo bromo provienen de plantas terrestres.<sup>25,26</sup> En consecuencia, la bromación de extractos de plantas de nuestra región ricas en esqueletos naturales con grupos funcionales blancos de reacción, permitiría generar moléculas potencialmente novedosas.

La reacción de bromación procede sobre dobles enlaces y anillos aromáticos mediante mecanismos de adición y sustitución electrofílica respectivamente; el primero resulta en la adición de una molécula de bromo a carbonos  $sp^2$  y el segundo en el intercambio de un átomo de hidrógeno por un átomo de bromo. Ambos cambios aumentan la hidrofobicidad y el tamaño de la molécula, afectando tanto la forma como las propiedades electrónicas de las mismas.

La incorporación de halógenos es una estrategia común en el diseño de fármacos que tiene por objetivo cambiar las bioactividades y especificidades de moléculas hacia determinados blancos terapéuticos.<sup>31</sup> Por otro lado, hay estudios que demuestran que los compuestos que presentan halógenos se encuentran en mayor proporción en drogas que en PNs.<sup>32-34</sup> Por lo tanto, la bromación de extractos de especies vegetales que contengan esqueletos moleculares con grupos funcionales adecuados para este tipo de reacción, incrementaría la posibilidad de encontrar nuevas moléculas con propiedades biológicas de interés.

### 1.2.2. Sulfonilación

El contenido de azufre de los PNs extraídos de plantas es inferior al contenido observado en otras fuentes de origen natural.<sup>32</sup> De los 6.629 compuestos de origen vegetal reportados en la Base de Datos de Productos Naturales Bioactivos (*BDPNB*),<sup>35</sup> sólo 2,1 % presentan azufre en

sus estructuras. Los grupos funcionales azufrados en PNs son variados. Entre ellos se encuentran tioles, sulfuros, disulfuros, tiosulfonatos, tiosulfonatos, sulfóxidos, sulfonas, isotiocianatos, polisulfuros, ácidos sulfínicos y sulfénicos.<sup>36</sup>

La baja cantidad de compuestos con azufre encontrados en plantas, la relativamente baja diversidad de grupos funcionales encontrados dentro de ellos y las importantes actividades biológicas que muestran, hacen interesante la introducción de azufre en productos naturales de origen vegetal.

Una forma de incorporar azufre en esqueletos naturales es utilizar como blanco de reacción el grupo hidroxilo, grupo funcional encontrado en una alta proporción de productos naturales (70% aproximadamente). Una forma de modificar extractos naturales a través de estos grupos funcionales es por reacción con cloruros de sulfonilo en medio básico para dar sulfonilésteres.<sup>21</sup> En principio, esta reacción permite aumentar la proporción de azufre en los productos presentes en extractos vegetales incorporándolo como parte de un grupo funcional poco común entre los componentes de las plantas.

### **1.2.3. Hidracinólisis**

Como se mencionó anteriormente, el punto interesante en la modificación de extractos con reactivos químicos consiste en la selección de reacciones que introduzcan grupos funcionales “no naturales” ausentes normalmente en productos naturales de origen vegetal.

Si bien los grupos nitrogenados se encuentran presentes en una buena cantidad de productos naturales, su abundancia es inferior a la observada en poblaciones de moléculas empleadas como drogas. Dentro de los grupos nitrogenados presentes en productos naturales, aquellos que contienen dos átomos de nitrógeno adyacentes representan una porción minoritaria. Específicamente, las moléculas que contienen hidracinas, hidrazidas o hidrazonas sólo representan el 0,7% del total de metabolitos secundarios. En consecuencia, el grupo N-N se convierte en un fragmento interesante a ser introducido en esqueletos de productos naturales. La

modificación de grupos C=O, presentes en más del 60% de los PNs, ofrece el acceso óptimo para la incorporación de N a través del empleo de hidracina.<sup>15</sup>

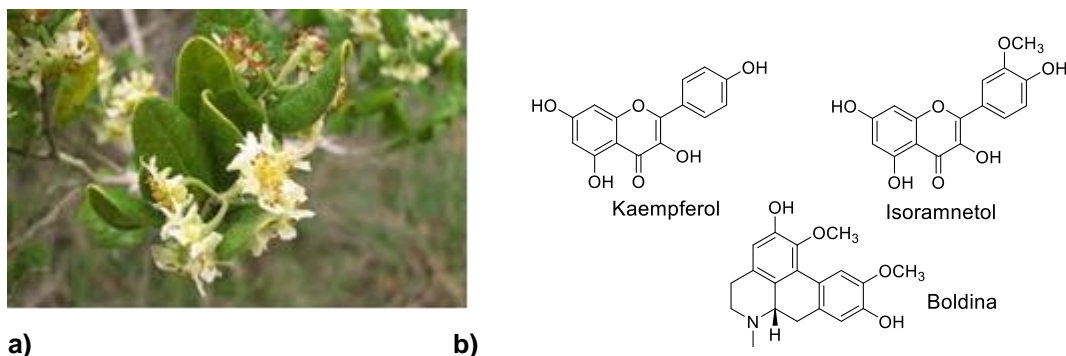
La hidracina monohidrato es un nucleófilo que no se encuentra comúnmente formando parte de metabolitos secundarios de plantas superiores. Por reacción con carbonilos de diferentes grupos funcionales (ésteres, aldehídos, cetonas) da lugar a la formación de hidrazidas y de hidrazonas que son más estables que los análogos provenientes de aminas.<sup>37</sup> En presencia de carbonilos  $\alpha,\beta$  insaturados pueden formar pirazolidinonas,<sup>38</sup> pirazoles,<sup>39</sup> pirazolininas<sup>40</sup> y otros heterociclos. Esta reacción posee el potencial no sólo de aumentar la proporción de nitrógeno sino también de grupos dadores de puente hidrógeno por molécula, parámetro cuyo valor también es inferior en poblaciones de compuestos de origen natural con respecto al encontrado en fármacos.<sup>41</sup>

### 1.3. Especies vegetales de uso medicinal como plataformas para diversificación molecular dirigida

Las plantas medicinales constituyen una fuente riquísima de principios activos, los cuales son utilizados en la producción de medicamentos o bien como modelos para la síntesis y generación de nuevos fármacos.<sup>42</sup> Los principios activos son metabolitos secundarios que las plantas producen generalmente para su propia defensa, tienen una gran variedad estructural y a partir de ellos se han descubierto drogas esenciales para la humanidad.<sup>43</sup> Hacia fines de 1970, la Organización Mundial de la Salud reconoce formalmente el rol de las plantas medicinales en la cura de diversas enfermedades que afectan al hombre y a partir de ese hecho, se ha constatado una creciente difusión de los conocimientos y los métodos para la obtención de principios activos a partir de productos naturales vegetales.<sup>44</sup>

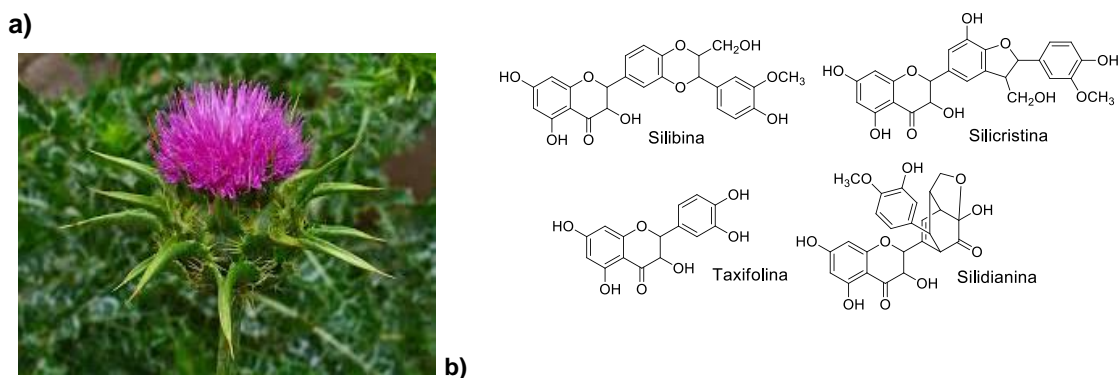
Existen en el mundo unas 300.000 especies vegetales de las cuales sólo se conoce el 10% de ellas, considerándose medicinales alrededor de 12.000 plantas.<sup>45</sup> Entre ellas, *Peumus boldus* Mol., conocida como boldo (**Figura 3a**), es utilizada para tratar dolores suaves del tracto

gastrointestinal, dispepsia y disfunciones hepatobiliares.<sup>46</sup> Posee acción aperitiva, digestiva, antiinflamatoria, antihelmíntica y fungicida. A dosis elevadas es anestésico, sedante e hipnótico.<sup>47</sup> Esta planta contiene flavonoides como isoraemnetol, kaempferol y alcaloides como boldina entre otros compuestos, los cuales incluyen grupos carbonilo, polifenoles y anillos aromáticos en sus estructuras (**Figura 3b**).

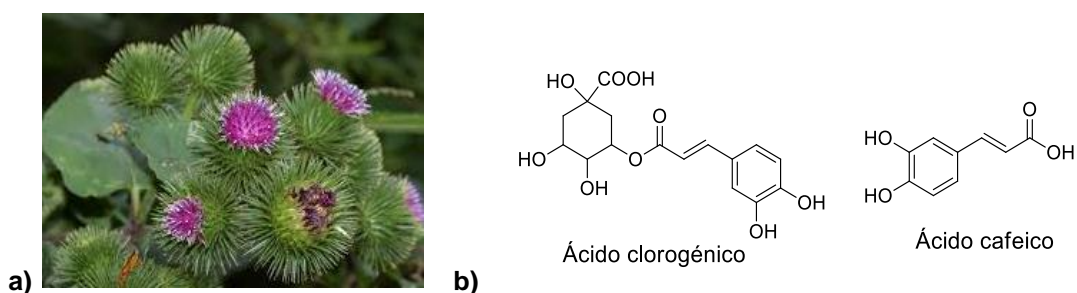


**Figura 3:** Fotografía de la planta de boldo (**a**) y representación de la estructura química de algunos de sus compuestos descritos en el texto (**b**).

*Silybum marianum* L., popularmente conocida como cardo mariano (**Figura 4a**), es utilizada para la profilaxis y tratamientos de los daños hepáticos de origen tóxico-metabólico (ej. consumo de alcohol, sustancias industriales tóxicas), en las alteraciones funcionales del hígado durante y después de la hepatitis, en las hepatopatías degenerativas crónicas, en cirrosis y esteatosis (hígado graso).<sup>48</sup> La acción antihepatotóxica está relacionada con la actividad antioxidante y captadora de radicales libres de sus componentes; actividad estabilizante de membrana; estimula la Polimerasa I, aumentando la síntesis de ARN ribosomal. Esto da un aumento de la síntesis de proteínas y aceleración de los procesos de regeneración celular.<sup>49</sup> La droga de esta especie contiene lípidos (constituidos principalmente por ácido linoleico) y esteroides; flavonoides del quersetol, taxifolina y eriodictiol; los flavanolignanos silibina, silicristina y silidianina (conocidos como silimarinas), los cuales presentan anillos aromáticos, fenoles y/o grupos carbonilo en sus estructuras (**Figura 4b**).

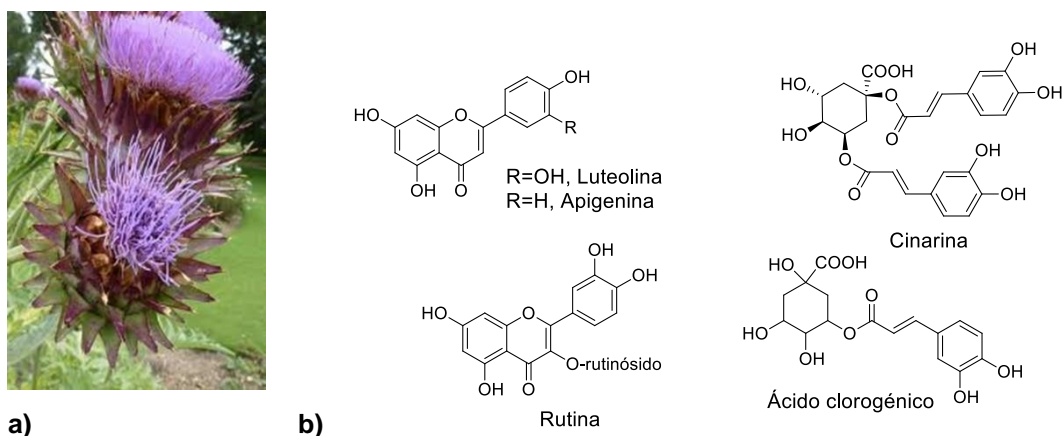


*Arctium lappa* L., popularmente conocida como bardana (Figura 5a), se considera hipoglucemiante, colagoga, analgésico y antirreumático, regulador gastrointestinal, vasodilatador coronario, desinfectante de la cavidad bucofaríngea, adaptógena y hepatoprotector.<sup>50</sup> En medicina popular se utiliza como diurético, purgante, contra cálculos biliares o urinarios y en trastornos reumáticos.<sup>51</sup> Esta planta contiene flavonoides y los ácidos fenólicos clorogénico y cafeico con propiedades antioxidantes.<sup>52</sup> Este tipo de compuestos incluyen grupos carbonilo, dobles enlaces, y anillos aromáticos en sus estructuras (Figura 5b), grupos funcionales aptos para modificación química.



*Cynara scolymus* L., popularmente conocida como alcaucil o alcachofa (Figura 6a), es especialmente útil en casos de ictericia y mala digestión de las grasas. Su acción colerética se atribuye a una sustancia amarga y aromática llamada la cinarina.<sup>53</sup> La misma estimula la secreción biliar y actúa sobre estados de estreñimiento, ya que la bilis permite activar

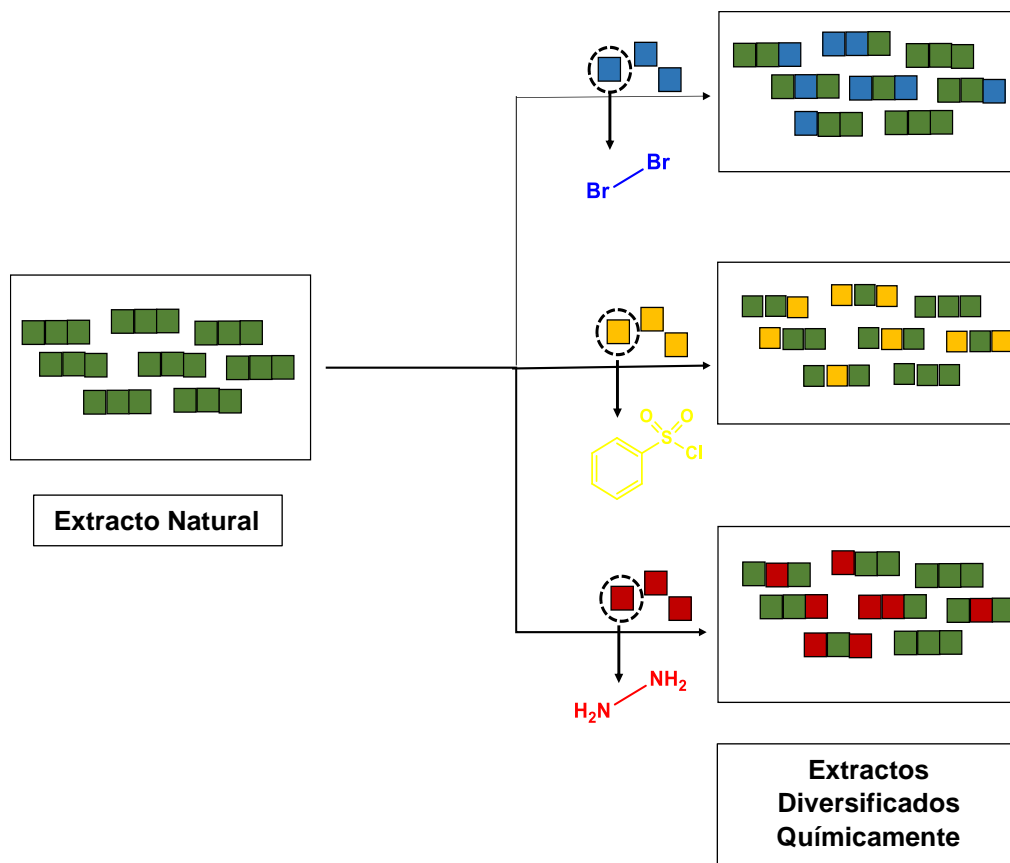
los movimientos intestinales contribuyendo a favorecer la eliminación de la materia fecal.<sup>54</sup> La alcachofa estimula la regeneración de las células del hígado cuando éstas están expuestas a diversas toxinas.<sup>55</sup> Por otro lado, también se han demostrado sus propiedades hipocolesterolemiantes.<sup>56</sup> Esta planta produce un elevado contenido de flavonoides (apigenina, rutina, luteonina), y polifenoles (ácido clorogénico y cinarina) con propiedad antioxidante<sup>57</sup> (**Figura 6b**).



**Figura 6:** Fotografía de la planta de alcaucil **(a)** y representación de la estructura química de sus compuestos descritos en el texto **(b)**.

Los compuestos mencionados para cada una de las especies citadas sólo representan una minoría dentro de la altísima diversidad de componentes que contienen. Sin embargo, conocer esta fitoquímica permite dirigir la preparación de extractos y la posterior modificación química en base a funciones químicas aptas para expandir el espacio de diversidad molecular que caracteriza a cada especie, con altas chances de dar lugar a la formación de nuevos compuestos con emergentes propiedades de reconocimiento biomolecular. Aplicando en paralelo adecuadas reacciones de modificación química sobre extractos ricos en determinados grupos funcionales, se potenciaría la incorporación de nuevos fragmentos relevantes como farmacóforos y en consecuencia cambiarían las propiedades químicas y biológicas de los extractos modificados.





#### 1.4. Análisis del impacto de las reacciones de modificación en extractos vegetales

##### 1.4.1. Comparación de los perfiles químicos de los extractos naturales y modificados

En vista de la diversidad química de los metabolitos secundarios de las plantas, los extractos vegetales son complejas mezclas difíciles de analizar. Si a ello se suma la complejidad de las moléculas potencialmente modificadas presentes en los extractos semisintéticos tras la reacción de modificación, el gran desafío de la estrategia recae en desarrollar o utilizar metodologías que permitan analizar la mayor cantidad de compuestos posibles desconociendo sus estructuras químicas.

Dentro de las técnicas analíticas útiles para establecer perfiles y construir legajos de mezclas complejas de metabolitos como son los extractos vegetales, pueden considerarse a las cromatográficas, a las espectroscópicas y a sus combinaciones las más relevantes.<sup>58</sup>



La cromatografía en capa delgada (CCD) ha sido muy usada para construir huellas dactilares de extractos vegetales. Es un método simple y eficiente que sirve para identificar metabolitos secundarios en las drogas vegetales, sus extractos y tinturas e igualmente para que en una formulación farmacéutica sea posible identificar la presencia de un metabolito secundario de interés farmacológico. Si se combina la CCD con el uso de diferentes reveladores químicos, se puede facilitar la identificación de los metabolitos secundarios.<sup>59</sup>

Para moléculas de mayor tamaño y para moléculas termolábiles, la separación por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) es mucho más apropiada. En particular, la CLAE acoplada a un detector UV (CLAE-UV) se ha utilizado intensivamente para el análisis de compuestos de origen natural. Entre las ventajas del detector UV respecto a otros se puede citar por ejemplo la posibilidad de detección de un amplio rango de compuestos, menor costo y fácil manejo.<sup>60</sup>

La cromatografía líquida asociada a detectores de masa (CL-EM) es una técnica muy usada para el análisis de mezclas complejas de origen natural que se ha impuesto como una combinación robusta que permite la identificación de cientos de metabolitos dentro de una biblioteca. Al acoplar técnicas de separación cromatográfica como LC a analizadores de masa, se logra una correcta deconvolución de los picos de mezclas complejas debido a la alta velocidad de escaneo que presentan estos instrumentos.<sup>61</sup>

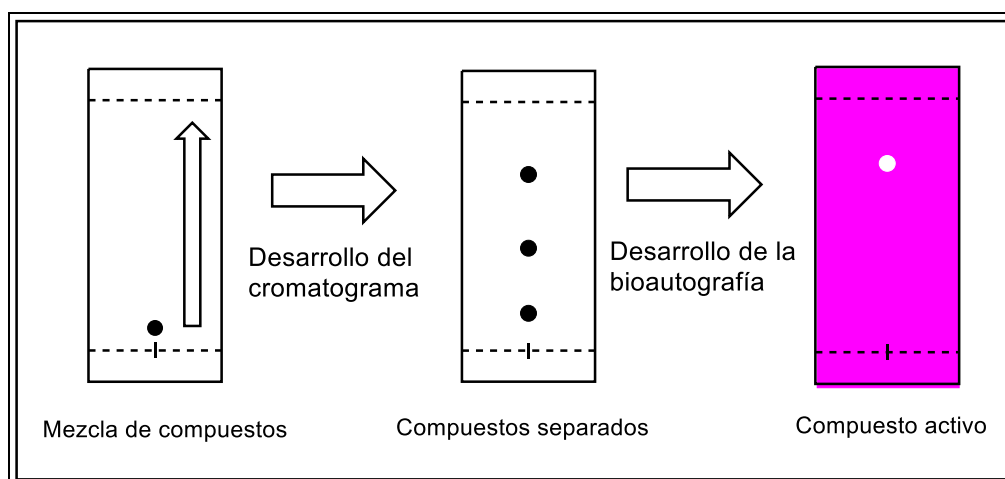
Dentro de las técnicas espectroscópicas, la resonancia magnética nuclear (RMN) se ha desarrollado como una herramienta para obtener huellas dactilares de mezclas complejas desde hace unas pocas décadas. Con RMN y la asistencia de métodos estadísticos como el análisis de componentes principales o de mínimos cuadrados parciales, se han logrado identificar y cuantificar diversos metabolitos presentes en plantas simultáneamente y sin separación cromatográfica.<sup>62</sup>

#### **1.4.2. Comparación de los perfiles de actividad de los extractos naturales y modificados**

Dado que los extractos (naturales y modificados) son mezclas

complejas de compuestos químicos, resulta interesante la utilización de ensayos sencillos que permitan estudiar sus actividades frente a entidades químicas y biológicas blanco dando información sobre el/los potencial/es componente/s responsable/s de la actividad, antes de ser aislado/s. A través de ensayos autográficos sobre placas cromatográficas este propósito puede ser alcanzado.

Los métodos autográficos consisten en separar por CCD los componentes de un extracto y luego “revelar” la placa cromatográfica usando un método de tinción que permita reportar alguna actividad. De esta forma, los componentes activos de la mezcla son detectados por los halos que ellos producen (**Figura 8**).

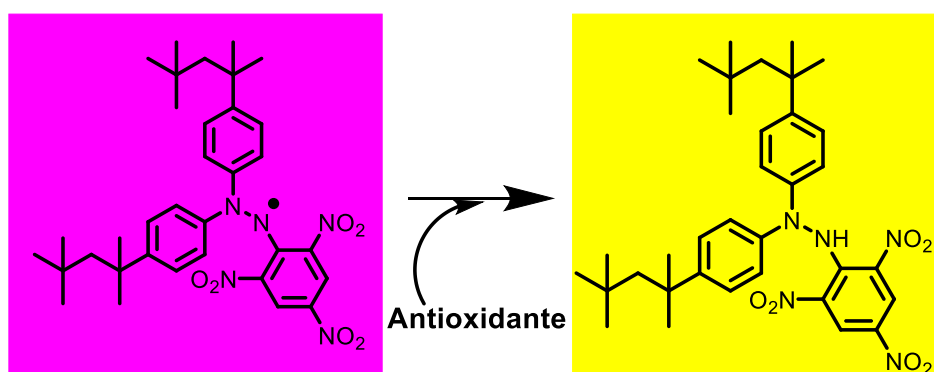


**Figura 8:** Etapas generales de un método autográfico: separación de los componentes de la mezcla y revelado de la misma.

Dado que estos métodos permiten combinar la capacidad separativa de la cromatografía en capa delgada con la determinación *in situ* de la actividad de los componentes de una mezcla de compuestos químicos, resulta posible pre-asignar de manera cualitativa actividades químicas o biológicas observadas en una mezcla a uno/s de sus componentes. De esta manera se puede estimar si la actividad de una mezcla es debida a la sumatoria de muchos compuestos activos o a un compuesto activo. Esta característica resulta particularmente atractiva para la comparación de los extractos naturales con los extractos químicamente modificados derivados de ellos. Además, permite la detección de actividad debida a exceso de

reactivo que produciría falsos positivos.

El efecto de la modificación química relacionado a las propiedades antioxidantes de los extractos puede ser estudiado utilizando un ensayo autográfico químico, rápido y versátil, con 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) como captador de radicales libres. El DPPH es un compuesto sintético estable que como radical libre es de color violeta. El mismo, al ser reducido por un compuesto capaz de donar átomos de hidrógeno se vuelve amarillo.<sup>63</sup> La autografía con DPPH consiste en rociar una solución de este reactivo sobre un cromatograma de los compuestos en estudio, detectando rápidamente a los captadores de DPPH como puntos amarillos en una matriz violeta (**Figura 9**).



**Figura 9:** Reacción de captación del radical DPPH por parte de compuestos antioxidantes.

#### 1.4.3. Propiedades biomoleculares de los extractos naturales y modificados

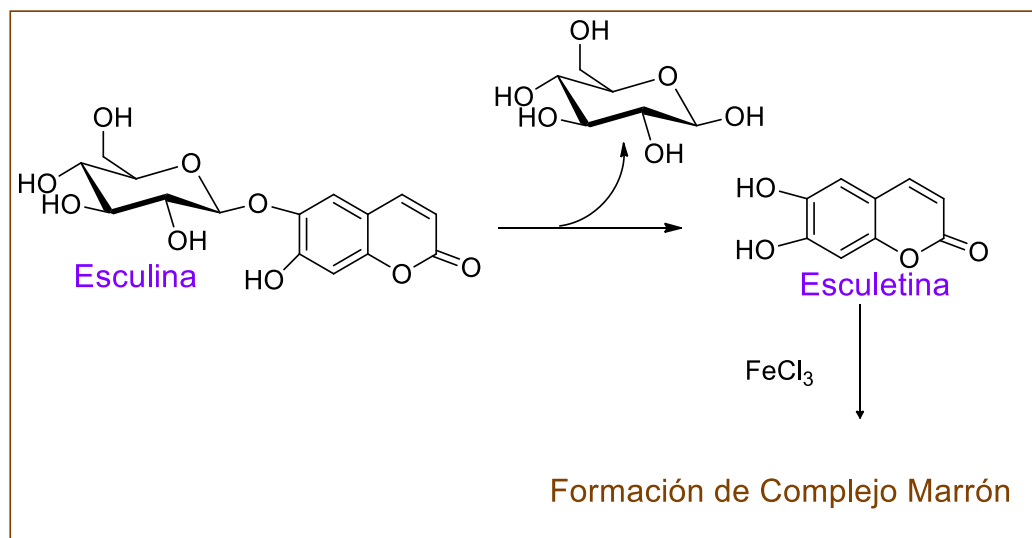
Las autografías han sido usadas por años para determinar actividad antibacteriana<sup>64</sup> y antifúngica<sup>65</sup>. En nuestro laboratorio se desarrollaron nuevos métodos autográficos para la detección de inhibidores de las enzimas  $\beta$ -glucosidasa, acetilcolinesterasa, xantina oxidasa y tirosinasa.

##### 1.4.3.1 Actividad inhibitoria de la enzima $\beta$ -glucosidasa

La enzima  $\beta$ -glucosidasa cataliza la hidrólisis de enlaces tipo  $\beta$  de polisacáridos, oligosacáridos, disacáridos y heterósidos, por lo cual

pertenece al grupo de las hidrolasas. Están involucradas en procesos biológicos tales como digestión y biosíntesis de glucoproteínas. Las glucosidasas se encuentran en el tracto intestinal y en la saliva, lugar donde se degradan los hidratos de carbonos complejos, como la lactosa, el almidón y la sacarosa.<sup>66</sup> Los inhibidores de glicosidasas han sido sujetos de gran interés<sup>67</sup> debido a su potencial como drogas para el tratamiento de cáncer,<sup>68</sup> de diabetes,<sup>69</sup> infección viral,<sup>70</sup> obesidad<sup>71</sup> y enfermedades hereditarias de depósito lisosomal<sup>72</sup>.

Los extractos naturales y modificados pueden ser analizados por su actividad sobre  $\beta$ -glucosidasa llevando a cabo una técnica autográfica reportada por nuestro grupo.<sup>73</sup> La autografía está basada en la reacción de  $\text{FeCl}_3$  con esculetina (producto de la hidrólisis de esculina) **Figura 10**. El procedimiento general consiste en generar, sobre la placa cromatográfica objeto de análisis, un gel de agar que contiene la enzima y el revelador (solución de  $\text{FeCl}_3$ ). Posteriormente la placa con el gel es sumergida en una solución de sustrato para activar el proceso catalítico.



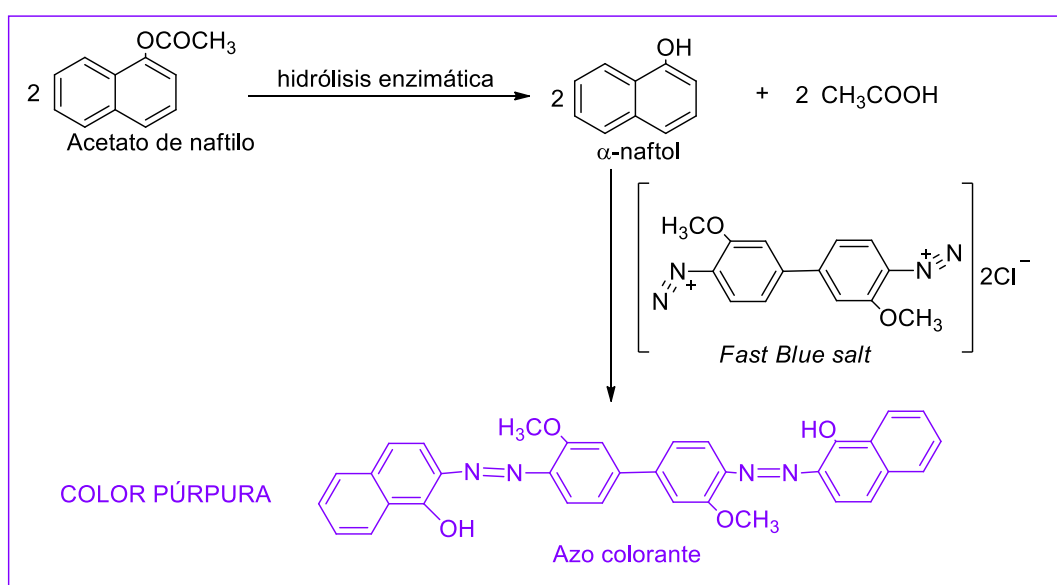
**Figura 10:** Reacción de detección de inhibidores de la enzima  $\beta$ -glucosidasa

#### 1.4.3.2. Actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa

La enzima acetilcolinesterasa cataliza la degradación de la acetilcolina. La falta de este neurotransmisor tiene una incidencia considerable en los procesos cerebrales y funciones cognitivas. El hallazgo de inhibidores de esta enzima resulta de gran importancia para la medicina,

entre otros motivos, por ser considerada un blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.<sup>74,75</sup>

Se han descrito dos métodos autográficos para la búsqueda de inhibidores de esta enzima a partir de mezclas; uno de ellos fue desarrollado por el grupo de Verpoorte<sup>76</sup> y el otro por el grupo de Hostettmann<sup>77</sup>. El ensayo desarrollado por Hostettmann y colaboradores se basa en la hidrólisis de acetato de naftilo catalizada por la enzima acetilcolinesterasa. El naftol producto de esta hidrólisis reacciona con *fast blue* generando un derivado coloreado (**Figura 11**).



**Figura 11:** Reacción de detección de actividad de la enzima acetilcolinesterasa (Método de Hostettmann).

El ensayo consiste en el rociado de una solución de la enzima sobre placa cromatográfica que, luego de un período de incubación, es seguido por la aplicación de una solución de acetato de naftilo y *fast blue* por rociado también. Los compuestos inhibidores se observan como puntos claros en una matriz púrpura.

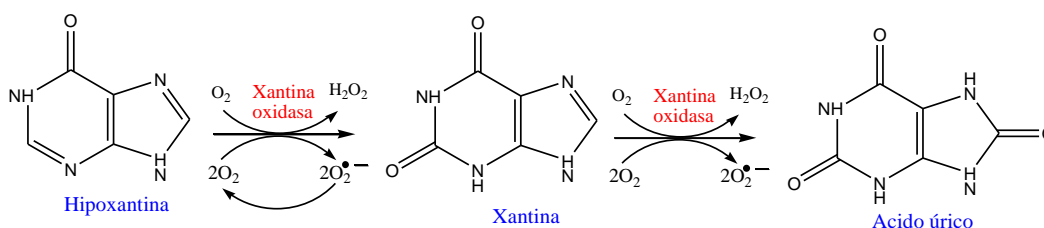
Para monitorear las propiedades inhibitorias de acetilcolinesterasa de extractos modificados, este ensayo autográfico es utilizado con algunas modificaciones introducidas, las cuales consisten en rociar inicialmente la placa con una solución de acetato de naftilo y *fast blue*, para luego depositar una solución acuosa de enzima y agar (inmovilización de la enzima en gel

de agar). Finalmente, el sistema se deja a temperatura ambiente hasta que el gel se colorea de violeta.

#### 1.4.3.3. Actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa

La xantina oxidasa cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y luego cataliza la hidroxilación oxidativa de xantina a ácido úrico, generando al mismo tiempo superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrógeno (**Figura 12**).<sup>78</sup>

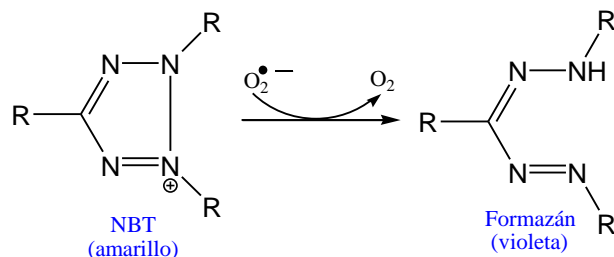
La generación de peróxido, oxígeno y otros radicales libres, se asocia con varias patologías, entre ellas, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico.<sup>79</sup> Además cumple un rol importante durante reperusión-isquemia de tejidos.<sup>80</sup> Por otro lado, si se produce demasiado ácido úrico, la concentración en sangre aumenta y puede llegar a saturar, precipitándose en forma de cristales de urato en las articulaciones, riñones y en otros tejidos, provocando complicaciones diversas.<sup>81</sup> Por todo lo mencionado, la inhibición de esta ruta enzimática tiene un importante interés terapéutico.



**Figura 12:** Oxidación de hipoxantina y xantina por acción de la enzima xantina oxidasa para producir ácido úrico.

La autografía sobre placa delgada para detectar inhibidores de la enzima xantina oxidasa fue desarrollada por nuestro grupo.<sup>82</sup> El ensayo consiste en depositar sobre una placa cromatográfica una solución que contiene una mezcla de la enzima, un agente gelificante (agar) y el revelador cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT). Una vez que se forma el gel se incuba la placa en estufa a  $28^\circ C$  y posteriormente se la sumerge en una solución del sustrato xantina. Después de unos minutos, el gel toma una coloración violeta dada por un compuesto del tipo formazán, el cual se genera por la reducción del NBT debido a la acción del superóxido que se

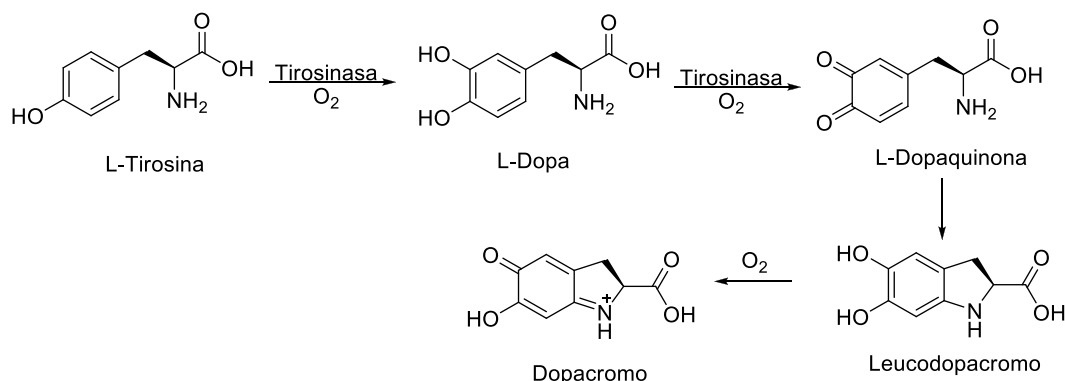
genera en el proceso catalítico (**Figura 13**). Los compuestos inhibidores se observan como puntos claros en una matriz violeta.



**Figura 13:** Reducción de NBT por acción de radical superóxido

#### 1.4.3.4. Actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa

La tirosinasa o polifenol oxidasa (PPO) es una enzima bifuncional cuprífera ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales que cataliza la producción de melanina y otros pigmentos, por oxidación de L-tirosina.<sup>83</sup> Dentro de los escasos sustratos que dan lugar a la formación de productos coloreados, hay dos de sus sustratos naturales: la tirosina y la L-dopa. Estos son sustratos para la actividad cresolasa (hidroxilación de monofenoles) y catecolasa (oxidación de difenoles a quinonas), respectivamente. El producto obtenido a partir de ambos sustratos es la misma o-quinona debido a que L-dopa es producto de la primera reacción y sustrato de la segunda (**Figura 14**). Esta o-quinona, dopaquinona, se transforma espontáneamente en dopacromo que absorbe a 480 nm.<sup>84</sup>



**Figura 14:** Reacciones catalizadas por la enzima tirosinasa a partir de su sustrato natural L-tirosina.

La tirosinasa es conocida por ser una enzima clave en la biosíntesis de melanina, la cual es la responsable de la coloración de cabello y piel en mamíferos. Diversos trastornos dermatológicos, tales como melasma, manchas de la edad y sitios de daño actínico, surgen a partir de la acumulación de un nivel excesivo de pigmentación epidérmica.<sup>85</sup> También ha despertado gran interés la implicancia de la melanina en el melanoma maligno, un tipo de tumores cutáneos de alto índice de mortalidad.

Además, la tirosinasa es responsable del pardeamiento enzimático indeseado de frutas y vegetales que se produce durante la senescencia o luego de daños en el momento de la manipulación post-cosecha, lo que hace que la identificación de nuevos inhibidores de la tirosinasa sea importante para mantener la calidad de estos alimentos hasta la llegada al consumidor.<sup>86</sup>

Por todo esto, el descubrimiento de nuevos inhibidores de tirosinasa resulta atractivo por sus potenciales aplicaciones para la mejora del valor nutricional y la calidad de alimentos, la prevención y el tratamiento de desórdenes de pigmentación y de otros problemas de salud relacionados con la melanina en humanos.

La autografía sobre placa delgada para detectar inhibidores de la enzima tirosinasa fue desarrollada por nuestro grupo.<sup>87</sup> El ensayo consiste en depositar sobre una placa cromatográfica una solución que contiene una mezcla de la enzima, un agente gelificante (agar) y el sustrato, la L-tirosina. Una vez que se forma el gel se incuba la placa en estufa a 28°C. Después de unos minutos, el gel toma una coloración rosada. Los compuestos inhibidores se observan como puntos claros en una matriz rosada.

#### **1.4.3.5. Búsqueda de inhibidores del bromodominio TcBDF3 de *Trypanosoma cruzi***

El parásito *Trypanosoma cruzi* causa la enfermedad de Chagas endémica en 21 países de América Central y del Sur. Los casos de enfermedad de Chagas están aumentando en los Estados Unidos, Canadá y muchos países europeos debido a la migración humana. A nivel mundial hay 10 millones de personas infectadas ocupando Argentina el primer



puesto en América. El 4 % de la población Argentina tiene la enfermedad de Chagas. La infección por *T. cruzi* y la enfermedad de Chagas se caracterizan por diagnósticos deficientes, tratamiento inadecuado y ausencia de vacunas.<sup>88</sup>

Las opciones de tratamiento para la enfermedad de Chagas son actualmente muy limitadas. Sólo se utilizan dos antiguas drogas nitro-heterocíclicas: benznidazol (Rochagan / LAFEPE y Abarax/ ELEA) y nifurtimox (LAMPIT / Bayer). Estos fármacos tienen numerosos efectos secundarios como dermatitis alérgica, prurito, fiebre e intolerancia gastrointestinal.<sup>89</sup> En consecuencia, existe una necesidad urgente de nuevos fármacos seguros y eficaces para las fases aguda y crónica de la enfermedad.<sup>90</sup>

Los bromodominios reconocen y se unen selectivamente a los residuos de acetilisina presentes en las proteínas histonas y no histonas. La desregulación de bromodominios ha sido implicada en el desarrollo de un amplio espectro de enfermedades, por lo que es un blanco atractivo para el descubrimiento de fármacos. El genoma de *T. cruzi* tiene seis bromodominios. Uno de ellos, TcBDF3, es no nuclear e interactúa con  $\alpha$ -tubulina acetilada. TcBDF3 es un blanco interesante debido a su participación en la morfogénesis flagelar y diferenciación del parásito.<sup>91</sup>

La interacción entre TcBDF3 con mezclas modificadas se analiza *in vitro* midiendo los cambios en la fluorescencia intrínseca de TcBDF3. Este ensayo aprovecha la fluorescencia de un triptófano presente en el bolsillo hidrófobo del bromodominio que se inactiva cuando un compuesto se une al bolsillo de unión a acetyl-lisina.<sup>91</sup>







## **2. OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivos generales**

Obtener bibliotecas de extractos modificados a partir de plantas medicinales con propiedades biológicas diferentes a la de sus extractos naturales de partida.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Comparar diferentes métodos extractivos para la obtención de extractos crudos de partida para su posterior modificación química.
- Obtener extractos modificados por aplicación de reacciones con hidracina, cloruros de alquilsulfonilo, bromo, entre otros reactivos.
- Evaluar el impacto de las reacciones sobre las propiedades químicas de las mezclas.
- Evaluar el impacto de las reacciones sobre las propiedades biomoleculares de las mezclas.
- Aislar y elucidar la estructura de los compuestos semisintéticos biológicamente activos.



### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





# CAPÍTULO I

### 1.1 Preparación y selección de extractos naturales a modificar

En este trabajo de tesis se seleccionaron de entre 52 muestras vegetales de uso en medicina popular, 3 muestras de una especie crecida por cultivo en el campo experimental Parque Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNR y 3 muestras de especies que crecen espontáneamente en nuestro país. Las mencionadas muestras corresponden a la droga de las especies *Cynara cardunculus* var. *scolymus* cultivar Oro Verde, cultivar Gauchito y cultivar Gurí, *Peumus boldus*, *Arctium lappa* y *Sylibum marianum*, respectivamente.

En farmacobotánica, se denomina droga vegetal al órgano de la planta que posee los principios activos. La droga de *C. scolymus* y *P. boldus* son las hojas, de *A. lappa* raíces y tallos, de *S. marianum* los frutos.

Para la preparación de los extractos naturales se utilizó droga fresca en el caso de las cultivares de *C. scolymus*, mientras que de las demás especies se utilizó la droga seca. Las técnicas de extracción aplicadas fueron extracción por maceración (a 25 °C) y extracción por calentamiento a reflujo. Estas técnicas se aplicaron en serie partiendo de cada droga vegetal utilizando metanol como solvente, de acuerdo a la metodología descrita en Materiales y Métodos (**Sección 5.3** de esta Tesis). Los dos tipos de extracciones se realizaron con el fin de estudiar si existen diferencias en la composición química de los extractos por la aplicación de calor. En el caso particular de *S. marianum*, previo a las mencionadas técnicas de extracción, se aplicó soxhlet para separar de la droga el alto contenido de grasas que posee.

Una vez preparados todos los extractos la composición química de los mismos fue analizada. Para ello, se utilizaron técnicas cromatográficas como cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL-EM).

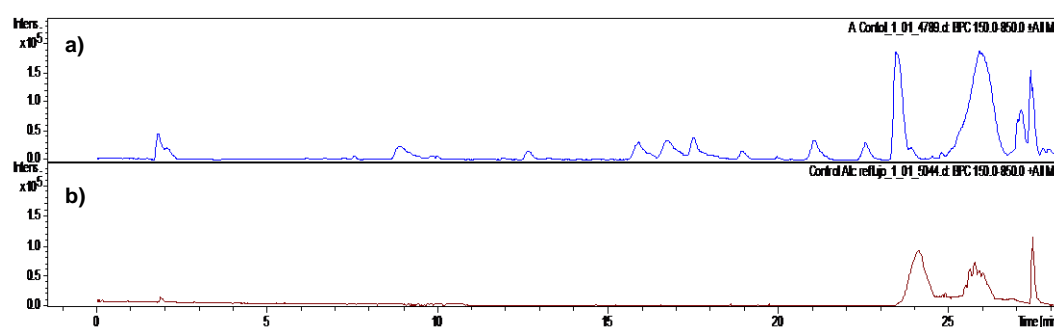
Los perfiles cromatográficos en CCD (fase normal) de los extractos obtenidos por maceración y reflujo, observados bajo luz UV a 365 nm, mostraron claras diferencias de composición (**Figura 14**). El extracto obtenido por reflujo (EPR en la figura 14), es rico en componentes polares,

mientras que el obtenido por maceración (EPM en la figura 14) posee componentes de variada polaridad.



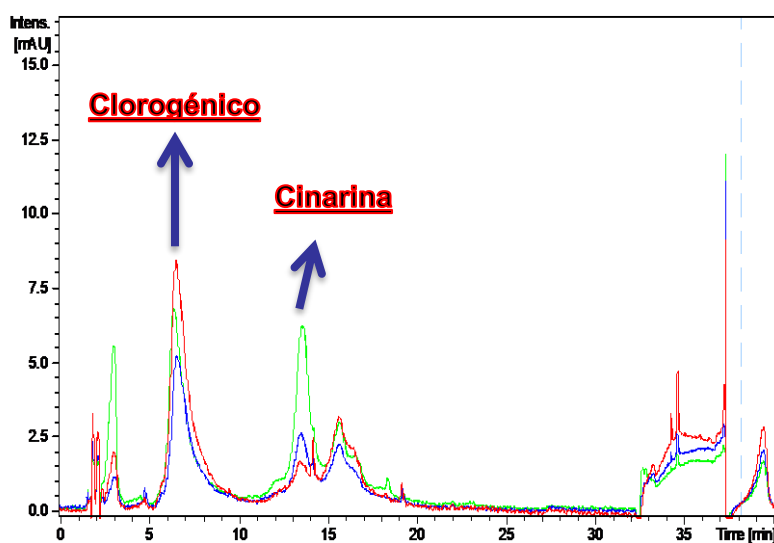
**Figura 14:** Perfiles de CCD. Fase estacionaria sílica gel 60 F<sub>254</sub> y fase móvil AcOEt:Fórmico:Acético:Agua (100:11:11:26). Extracto de partida obtenido por reflujo (EPR) y Extracto de partida obtenido por maceración (EPM) revelados con luz UV365.

Estos extractos analizados por CL-EM en fase reversa (**Figura 15**), también mostraron claras diferencias de composición. El perfil de CL-EM del extracto macerado (**Figura 15a**) reforzó el observado por CCD, presentando picos con diferentes tiempos de retención a lo largo de todo el cromatograma tanto en modo de ionización positivo como negativo. En cambio, el extracto obtenido por reflujo mostró picos con altos tiempos de retención particularmente en modo de ionización positivo (**Figura 15b**), brindando información adicional a la aportada previamente por CCD donde sólo se habían detectado componentes polares.

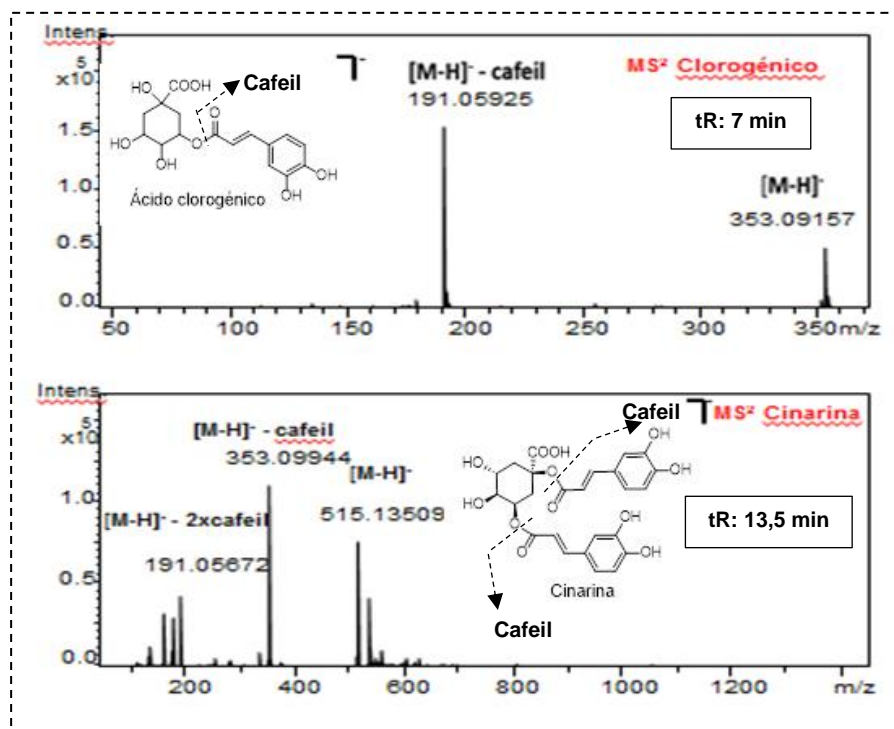


**Figura 15:** Perfiles de CL-EM en modo de ionización positivo de los extractos nativos de *Cynara scolymus* obtenidos por maceración (a) y reflujo (b). Las condiciones fueron: temperatura del desolventador: 400°C, volumen de inyección: 2 µL, velocidad de flujo de Nitrógeno: 0.8 L/min, fase móvil: acetonitrilo calidad HPLC (canal A) y ácido fórmico calidad HPLC 0.1% (canal B). El gradiente de elución está dado como (min)/(%) canal A: 0/30, 7/50, 10/70, 13/70, 16/80, 18/80, 20/30 y 22/30. Voltaje del capilar: 2 kV, voltaje de la celda de colisión: 3 V.

Los extractos naturales obtenidos por maceración en *C. scolymus* mostraron contener ácido clorogénico y cinarina al comparar sus perfiles de LC-UV-EM con los correspondientes a las sustancias de referencia ácido 5-cafeilquínico y 1,3-dicafeilquínico. Estos compuestos son ésteres fenólicos derivados de los ácidos cafeico y quínico y su contenido en la planta depende entre otros factores del genotipo. Utilizando experimentos de CL-UV a 280 y 330 nm acoplados a EM de alta resolución se estudió el perfil químico de los extractos naturales de *C. scolymus* de las cultivares Oro Verde FCA, Gauchito FCA y Gurí FCA con el fin de seleccionar la cultivar con mayor proporción de ésteres cafeilquínicos. Los cromatogramas obtenidos por CL-UV para los extractos de las tres cultivares (**Figura 16**) y los espectros de EM/EM del ácido clorogénico y cinarina detectados en ellos (**Figura 17**), permitieron la cuantificación de estos componentes en las tres cultivares utilizando los patrones de referencia.



**Figura 16:** Perfiles cromatográficos obtenidos por CL-UV a 330 nm, de los extractos metanólicos preparados por maceración de las hojas de *C. scolymus* (cultivar Gauchito en trazo color verde, cultivar Gurí en trazo rojo y cultivar Oro Verde en trazo azul). Se utilizaron solventes de calidad HPLC-MS en gradiente (agua y acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1%), con flujo de 0,2 ml/min. Volumen de inyección: 4 µl. Columna Hypersil Gold Thermo Scientific C18 (2,1 x 150 mm x



**Figura 17:** Espectros de EM/EM en modo de ionización negativo (-ESI) mostrando las fragmentaciones postuladas para el ácido clorogénico y cinarina detectados en el extracto macerado de hojas de *C. scolymus* cultivar Gauchito.

El análisis cuantitativo de los extractos de las cultivares estudiadas mostró los resultados que se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Resultados de los estudios de cuantificación de los ácidos monocafeilquínicos (MCQs, calculados a partir de ácido clorogénico) y dicafeilquínicos (DCQs, calculados a partir de 1,3-dicafeilquínico), expresados en mg mL<sup>-1</sup> de extracto. OV (Oro verde), GA (Gauchito), GU (Gurí). n.d.: no detectado

Compuestos	mg mL <sup>-1</sup> extracto OV	mg mL <sup>-1</sup> extracto GA	mg mL <sup>-1</sup> extracto GU
MCQs	0,0228 ± 0,0106	0,0554 ± 0,0021	0,0603 ± 0,0170
DCQs	0,0075 ± 0,0035	0,0726 ± 0,0105	n.d.
Total CQs	0,0303 ± 0,0141	0,1280 ± 0,0126	0,0603 ± 0,0170

(p < 0,00001).

Estos resultados fueron analizados estadísticamente (*Chi cuadrado*), indicando que existen diferencias altamente significativas en el tipo de ácidos cafeilquínicos presentes en hojas de las cultivares en estudio, como así también existen diferencias significativas en la proporción de cafeolquínicos de hojas entre los cultivares de alcaucil, siendo Gauchito el cultivar que más aporta a las diferencias ( $p < 0,00001$ ). Los resultados obtenidos permiten concluir que Gauchito es la cultivar con mayor contenido de ésteres cafeilquínicos y en consecuencia sus extractos fueron los seleccionados para modificación química.

Los extractos de las demás especies en estudio fueron analizados cualitativamente por CCD. Los perfiles cromatográficos de los extractos de *S. marianum* mostraron composiciones diferentes comparando los extractos obtenidos por maceración y por reflujo, por lo cual todos los extractos provenientes de estas dos especies fueron seleccionados para modificación química. En cambio, los extractos de *A. lappa* y *P. boldus* obtenidos por maceración y calentamiento a reflujo mostraron perfiles cromatográficos muy similares, por lo cual sólo los extractos obtenidos por maceración fueron seleccionados para su posterior modificación química ya que el rendimiento de la extracción fue mayor en este caso que el obtenido mediante calentamiento a reflujo.

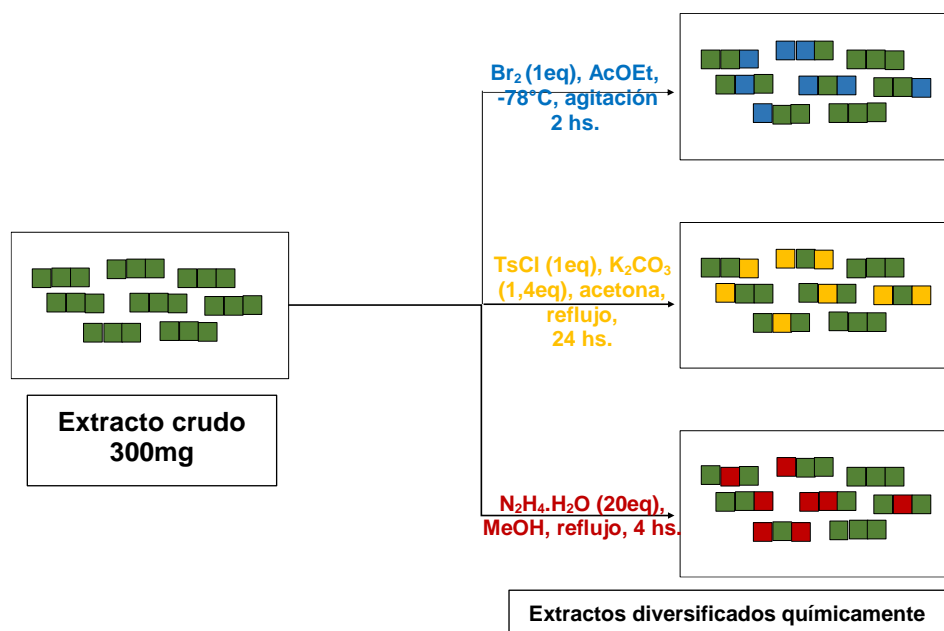
Como ventajas de la maceración pueden mencionarse la utilización de equipos simples que requieren mínimas cantidades de energía y extracción sin alteraciones de componentes por efecto de la temperatura. Sin embargo, se necesitan períodos de tiempo extensos para lograr una extracción exhaustiva.

En la extracción por calentamiento a reflujo, el material vegetal es sometido a la temperatura de ebullición del solvente utilizado. El tiempo que se emplea, en este caso, es menor respecto a la extracción por maceración ya que al utilizar calor se acelera el proceso de disolución. La desventaja del calentamiento a reflujo es que los compuestos termolábiles se ven afectados por la temperatura y además requiere equipos más sofisticados con fuente de calor.

En resumen, los extractos que se seleccionaron para modificación química corresponden a las drogas de *C. scolymus* cultivar Gauchito obtenido tanto por maceración como por calentamiento a reflujo, de *S. marianum* obtenidos por Soxhlet, maceración y calentamiento a reflujo, de *P. boldus* y *A. lappa* obtenidos por maceración.

## 1.2 Modificación química de extractos seleccionados

De acuerdo con los protocolos descritos en Materiales y Métodos (**Sección 5.4**), se modificaron en paralelo cada uno de los 7 extractos previamente seleccionados siguiendo el esquema de reacción que se presenta a continuación:



Tal como se muestra en el esquema las reacciones de modificación aplicadas en este trabajo de tesis son: i) Bromación, utilizando como reactivo bromo; ii) Sulfonilación, utilizando cloruro de *p*-toluen sulfonilo (TsCl), iii) Hidracinólisis, con hidracina monohidrato como reactivo. Para cada caso se siguió el protocolo correspondiente a cada reacción y de cada extracto crudo de partida se obtuvieron diferentes subfracciones de acuerdo a la reacción de modificación aplicada. A partir de la reacción de bromación se genera sólo una subfracción de extracto modificado, a partir de la sulfonilación se producen dos subfracciones de extracto modificado y



a partir de la hidracinólisis se generan tres subfracciones de extracto modificado.

En la modificación con bromo, al finalizar la reacción se agrega una solución acuosa de tiosulfato de sodio para reducir el bromo en exceso. Luego se hacen extracciones líquido-líquido con AcOEt para desechar bromuro en la fase acuosa y obtener la subfracción de extracto modificado en AcOEt.

En la modificación por sulfonilación la eliminación del reactivo sulfonilante en exceso se realiza utilizando la resina *tris*(2-aminoetil)-amino poliestireno. El crudo de reacción se disuelve en DCM, se agita en presencia del polímero por 4 h, se filtra y lava con DCM inicialmente y posteriormente con MeOH (previa agitación por 24 h). De esta manera se producen dos subfracciones de cada extracto modificado, una subfracción DCM y otra subfracción MeOH.

En la reacción de hidracinólisis aplicada a cada extracto se obtiene un crudo de reacción al que se le agrega agua y posteriormente se evapora con el fin de eliminar la hidracina en exceso. Una vez llevado a sequedad, se redisuelve en agua y se hacen particiones líquido-líquido con DCM, AcOEt y BuOH. De esta manera se generan las tres subfracciones de extracto modificado.

Luego de la modificación química de los extractos naturales seleccionados, se procedió a la estimación de los rendimientos alcanzados en cada caso. Al desconocerse la composición química exacta de los extractos de partida y de los modificados, los rendimientos de las reacciones de modificación no pueden calcularse de la manera en que normalmente se hace para reacciones químicas a partir de sustratos puros. De todas formas, aunque se conocieran con exactitud las composiciones químicas de los extractos de partida, los cálculos de los rendimientos serían engorrosos por la gran cantidad de compuestos diferentes presentes en la mezclas. Por lo tanto, los rendimientos se calcularon como simples proporciones de masa recuperada relativa a la masa de partida según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Masa Recuperada}}{\text{Masa de Partida}} \times 100$$

El rendimiento calculado, en algunos casos, resultó ser mayor al 100% (**Tabla 2**). Estos resultados serían químicamente inaceptables si se

**Tabla 2:** Masas de partida y recuperada de los extractos (en g) y Rendimiento de la reacción de Bromación (%)

parte del concepto clásico de rendimiento químico, pero podrían interpretarse como un aumento en el peso molecular promedio (PMP) de los constituyentes de los extractos de partida, atribuibles a la incorporación de los reactivos en sus estructuras.

Extractos vegetales	Masa de partida (g)	Masa recuperada (g)	Rendimiento (%)
<i>Cynara scolymus</i> macerado	0,4247	0,4584	108
<i>Cynara scolymus</i> reflujo	0,3378	0,3682	109
<i>Silybum marianum</i> hexánico	0,4107	0,5940	145
<i>Silybum marianum</i> macerado	0,4032	0,4115	102
<i>Silybum marianum</i> reflujo	0,4544	0,5529	122
<i>Peumus boldus</i> macerado	0,4608	0,3962	86
<i>Arctium lappa</i> macerado	0,4648	0,2414	52

Los resultados obtenidos para la reacción de bromación indican que los extractos naturales de *C. scolymus* macerado y reflujo tanto como de *S. marianum* hexánico y reflujo presentan los mayores incrementos de masa recuperada, sugiriendo que poseen alta proporción de componentes que incorporan bromo en su estructura.

Teniendo en cuenta los rendimientos obtenidos para la reacción de sulfonilación (**Tabla 3**), se puede inferir que todos los extractos naturales de las especies estudiadas presentan cantidades significativas de

componentes con grupos funcionales reactivos frente a cloruro de *p*-toluensulfonilo.

**Tabla 3:** Masas de partida y recuperada de los extractos (en g) y Rendimiento de la reacción de Sulfonilación (%).

Extractos vegetales	Masa de partida (g)	Masa recuperada (g)	Rendimiento (%)
<i>Cynara scolymus</i> macerado	0,3495	0,8471	242
<i>Cynara scolymus</i> reflujo	0,3080	0,3368	109
<i>Silybum marianum</i> hexánico	0,3891	0,7353	189
<i>Silybum marianum</i> macerado	0,4335	0,4390	101
<i>Silybum marianum</i> reflujo	0,4344	0,4767	110
<i>Peumus boldus</i> macerado	0,4244	0,7730	173
<i>Arctium lappa</i> macerado	0,3934	0,5935	150

Finalmente, los rendimientos obtenidos para la reacción de hidracinólisis se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4:** Masas de partida y recuperadas de los extractos (en g) y Rendimiento de la reacción de Hidracinólisis (%).

Extractos vegetales	Masa de partida (g)	Masa recuperada (g)	Rendimiento (%)
<i>Cynara scolymus</i> macerado	0,4139	0,7009	169
<i>Cynara scolymus</i> reflujo	0,3213	0,4291	134
<i>Silybum marianum</i> hexánico	0,4341	0,2109	49
<i>Silybum marianum</i> macerado	0,3048	0,4668	153
<i>Silybum marianum</i> reflujo	0,3162	0,3187	101
<i>Peumus boldus</i> macerado	0,4104	0,3323	81
<i>Arctium lappa</i> macerado	0,3941	0,0329	8,3

Los resultados obtenidos indican que si bien el incremento de PMP debido a esta reacción es menos importante que el correspondiente a la

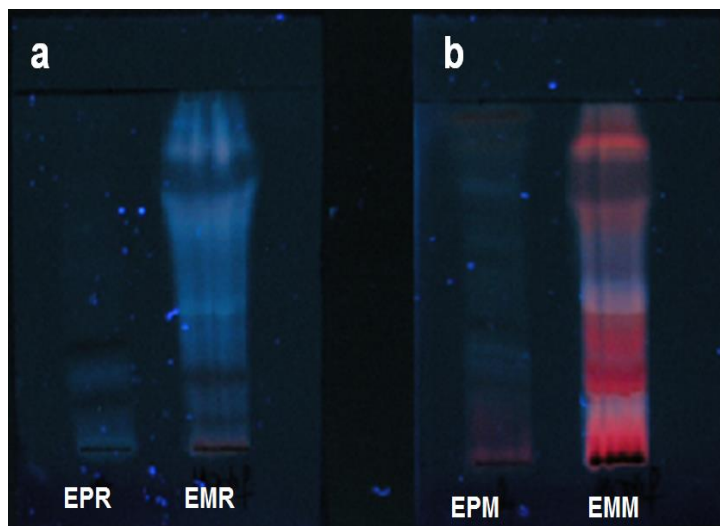
incorporación de bromo o del grupo sulfonilo, los extractos naturales de *C. scolymus* macerado y reflujo así como los de *S. marianum* macerado y reflujo evidentemente presentan alto contenido de componentes que reaccionan con hidracina dando lugar a productos de reacción que tienen, en suma, mayor masa que los compuestos originalmente presentes en el extracto vegetal de partida.

### 1.3 Análisis del impacto de la modificación en la composición química de los extractos

Como fue mencionado previamente, la diversidad química de las moléculas provenientes del metabolismo secundario de plantas presentes en los extractos de partida sumado a las potencialmente modificadas presentes en los extractos semisintéticos resultantes hacen que el gran desafío de la estrategia de diversificación molecular recaiga en desarrollar protocolos que permitan analizar la mayor cantidad de compuestos posibles desconociendo las estructuras químicas. Por ello, para analizar el impacto que produce la modificación química en los extractos vegetales en estudio se combinaron diferentes técnicas cromatográficas acopladas a detección UV y/o a analizadores de masa.

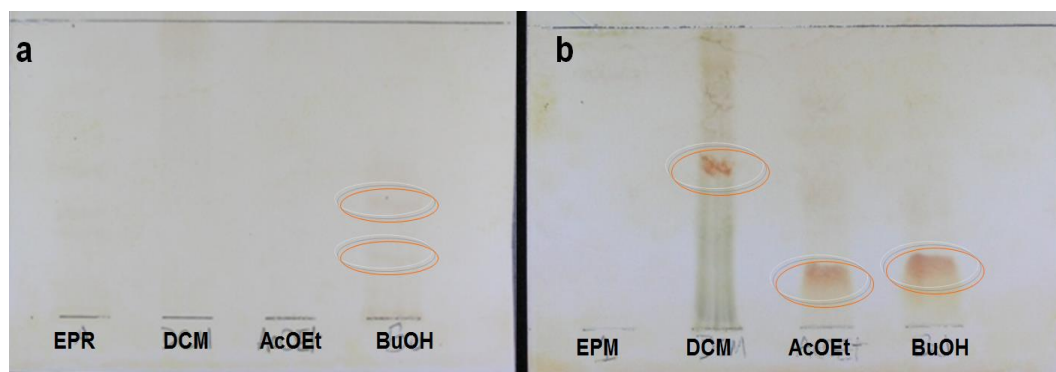
#### 1.3.1 Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD)

Los cromatogramas de los extractos de *C. scolymus* obtenidos por reflujo o por maceración y luego modificados con hidracina, EMR y EMM respectivamente, (**Figuras 18a y 18b**), muestran mayor número de componentes que los respectivos extractos de partida EPR y EPM bajo las condiciones cromatográficas utilizadas.



**Figura 18:** Perfiles de CCD. Fase estacionaria sílica gel 60 F<sub>254</sub> y fase móvil AcOEt:Fórmico:Acético:Agua (100:11:11:26). a) Extracto de partida obtenido por reflujo (EPR) y su extracto modificado (EMR). b) Extracto de partida obtenido por maceración (EPM) y su extracto modificado (EMM). Detector: luz UV<sub>365</sub>.

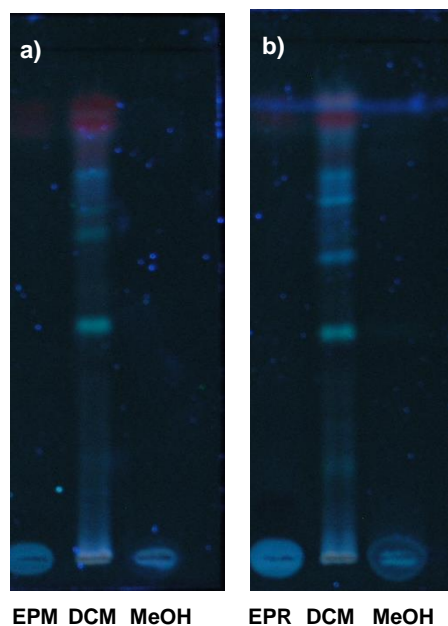
Cuando las placas cromatográficas fueron reveladas con ninhidrina, un reactivo revelador selectivo para grupos que contienen N, bandas rojo-amarronadas pudieron ser detectadas sólo en los extractos modificados sugiriendo la incorporación de nitrógeno en los mismos (comparar **Figuras 19a y 19b**). Estos resultados sugieren la existencia de reacciones entre hidracina y diferentes componentes de los extractos naturales previamente obtenidos por maceración o reflujo. Por otro lado, los extractos modificados particionados con solventes de polaridad creciente aportan información adicional respecto a la polaridad de los componentes que potencialmente contienen nuevos N. En el extracto obtenido por reflujo la ninhidrina revela compuestos presuntamente nitrogenados solamente en la subfracción BuOH, mientras que en el extracto modificado proveniente de maceración se revelan productos de este tipo en todas las subfracciones DCM, AcOEt y BuOH.



**Figura 19:** Perfiles de CCD correspondiente a los extractos de *C. scolymus*. Fase estacionaria sílica gel 60 F<sub>254</sub> y fase móvil AcOEt:Fórmico:Acético:Agua (100:11:11:26), revelados con ninhidrina. **a)** Extracto de partida obtenido por reflujo (EPR) y las fracciones obtenidas luego de la reacción con hidracina: DCM, AcOEt y BuOH. **b)** Extracto de partida obtenido por maceración (EPM) y las fracciones obtenidas luego de la reacción con hidracina: DCM, AcOEt y BuOH, observados al visible.

Un punto interesante de la modificación de extractos con reactivos químicos consiste en la selección de reacciones que introduzcan grupos funcionales “no naturales” ausentes normalmente en PNs de origen vegetal. La modificación de grupos C=O presentes en más del 70% de los productos naturales ofrece el acceso óptimo para la incorporación de N a través del empleo de hidracinas, por lo cual y como se demostró previamente, la hidracina monohidrato es un reactivo interesante para lograr modificar químicamente una buena parte de los PNs presentes en los extractos naturales y así diversificarlos químicamente.

La reacción de sulfonilación aplicada a los extractos macerado y reflujo de *C. scolymus* produce también cambios en la composición química de los mismos (**Figura 20**).

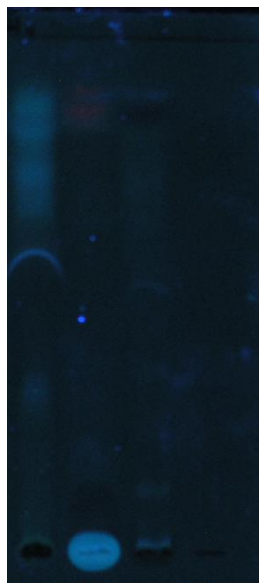


**Figura 20:** Perfiles de CCD correspondiente a los extractos de *C. scolymus*. Fase estacionaria sílica gel 60 F<sub>254</sub> y fase móvil DCM:MeOH (90:10). **a)** Extracto de partida obtenido por reflujo (EPR) y las fracciones obtenidas luego de la reacción con cloruro de *p*-toluen sulfonilo: DCM y MeOH. **b)** Extracto de partida obtenido por maceración (EPM) y las fracciones obtenidas luego de la reacción con cloruro de *p*-toluen sulfonilo: DCM y MeOH. Detector luz UV<sub>365</sub>

Los cromatogramas muestran componentes de baja polaridad en la fracción DCM lo cual es lógico teniendo en cuenta que dicha subfracción puede contener nuevos compuestos que incorporen *p*-toluen sulfonilo, haciendo menos polar/es a su/s molécula/s. Por otro lado comparando los perfiles correspondientes a las fracciones DCM de EPM y EPR se encuentran diferencias claras de composición.

La reacción de sulfonilación permite incorporar el grupo sulfonilo en moléculas que contienen –OH o –NH capaces de reaccionar con cloruro de *p*-toluen sulfonilo. El grupo sulfonilo presenta propiedades de reconocimiento interesantes y de acuerdo al grupo alquilo unido al azufre esta reacción sirve como puerta de entrada a la introducción de otros grupos de reconocimiento potencialmente interesantes para generar actividad biológica.

Por otro lado, la reacción de bromación aplicada a los extractos de *C. scolymus* genera también cambios de composición (**Figura 21**).



EPM AcOEt EPR AcOEt

**Figura 21:** Perfiles de CCD correspondiente a los extractos de *C. scolymus*. Fase estacionaria sílica gel 60 F<sub>254</sub> y fase móvil DCM:MeOH (80:20). Extracto de partida obtenido por maceración (EPM) y por reflujo (EPR), junto a las respectivas subfracciones (AcOEt) generadas luego de la reacción con bromo. Detector luz UV<sub>365</sub>

El cromatograma revela que luego de la modificación química desaparecen componentes de los extractos naturales. Cambiando las condiciones de desarrollo cromatográfico (se aumentó la polaridad de la fase móvil), se observaron nuevos componentes probablemente formados por moléculas del extracto natural con las cuales el bromo reacciona. Estas reacciones proceden mediante mecanismos de adición y sustitución respectivamente; el primero resulta en la adición de una molécula de bromo a carbonos  $sp^2$  y el segundo en el intercambio de un átomo de hidrógeno por un átomo de bromo. Ambos cambios aumentan la hidrofobicidad y el tamaño de la molécula, afectando tanto la forma como las propiedades electrónicas de las mismas. La incorporación de halógenos, como el bromo en este caso, es una estrategia común en el diseño de drogas que tiene por objetivo cambiar las bioactividades y especificidades de moléculas hacia determinados blancos terapéuticos.

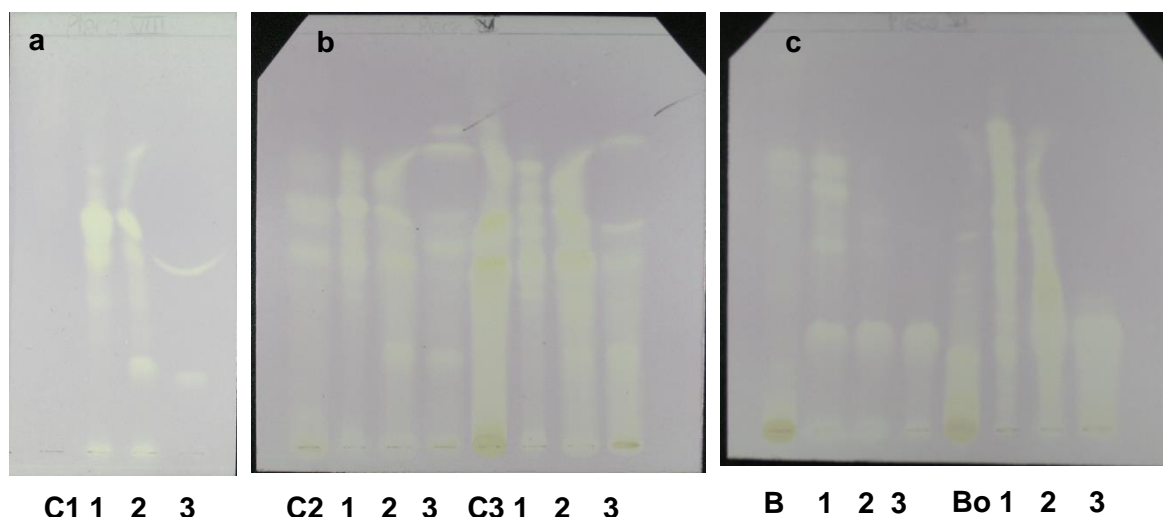
#### 1.4 Comparación de la actividad captadora de radicales DPPH de extractos naturales vs modificados con hidracina monohidrato

Con el fin de evaluar el efecto de la modificación química sobre las propiedades de los extractos preparados, los mismos fueron estudiados por



su capacidad captadora de radicales libres utilizando un ensayo autográfico químico con 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH).

Este ensayo se realizó para todos los extractos naturales y modificados en estudio. En el caso de los extractos de *S. marianum*, luego de aplicar la reacción de hidracinólisis se observa la presencia de nuevos compuestos captadores de radicales libres tanto en las subfracciones obtenidas a partir de la modificación del extracto hexánico C1 (**Figura 22a**, calles 1, 2 y 3), como así también en los extractos macerado C2 o reflujo C3 de *S. marianum* (**Figura 22b**). Los extractos naturales de *A. lappa* y *P. boldus* y sus respectivos extractos modificados (B y Bo con sus respectivas calles 1, 2 y 3 en **Figura 22c**), mostraron actividad captadora de radicales libres.



**Figura 22:** Cromatogramas de los extractos de partida de *Silybum marianum* (C1 hexánico, C2 macerado y C3 reflujo) y de los mismos modificados (1, 2, 3), *Arctium lappa* (B) y *Peumus boldus* (Bo) y de los mismos modificados (1, 2, 3). FE: sílicagel F<sub>254</sub> FM: DCM:MeOH (80:20). Revelador: DPPH.

La comparación de los perfiles cromatográficos de los extractos naturales y modificados con hidracina indica la existencia de cambios significativos de composición. Los extractos modificados presentan nuevas bandas captadoras de radicales libres, demostrando que nuevos compuestos emergen con esta actividad.

La reacción con hidracina resulta interesante como estrategia para alterar la composición química de los extractos estudiados e incrementar la diversidad de moléculas con propiedades captadoras de radicales libres.



## CAPÍTULO II

## **2.1 Análisis del impacto de la modificación química en las propiedades biomoleculares de los extractos**

Dado que los extractos naturales y modificados son mezclas complejas de compuestos químicos, resulta interesante la utilización de bioensayos sencillos sobre CCD que permitan estudiar la actividad biológica de los extractos con la ventaja de obtener información adicional sobre el/los potencial/es componente/s responsable/s de la actividad.

Como fue mencionado previamente, los métodos autográficos consisten en separar por CCD los componentes de un extracto y luego “revelar” la placa cromatográfica usando un método de tinción que permita reportar alguna actividad biológica.

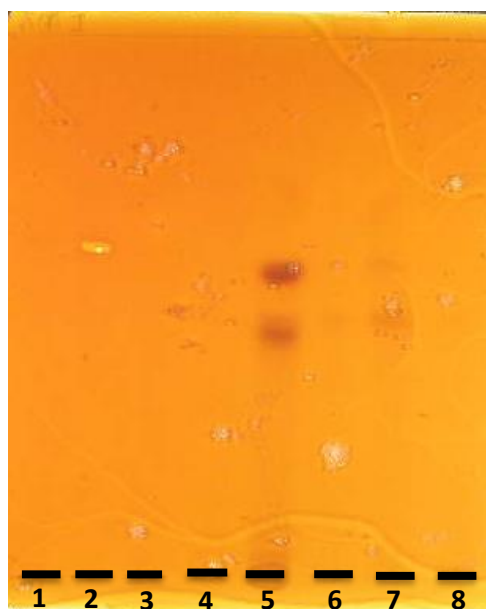
Con el objetivo de evaluar el impacto de la modificación en los extractos vegetales teniendo en cuenta los cambios que se producen en sus propiedades biomoleculares, se analizaron los extractos modificados utilizando como testigo el extracto de partida correspondiente. Los extractos fueron evaluados utilizando ensayos autográficos enzimáticos a fin de estudiar la capacidad de inhibir la actividad de las enzimas  $\beta$ -glucosidasa, acetilcolinesterasa, xantina oxidasa y tirosinasa. En todos los casos, las actividades se evaluaron sembrando 100  $\mu$ g de extracto y desarrollando las CCD con fase móvil DCM:MeOH (80:20).

### **2.1.1 Actividad inhibitoria frente a $\beta$ -glucosidasa**

Para evaluar potenciales cambios en las propiedades biomoleculares de los extractos introducidos por las diferentes reacciones de modificación aplicadas, se analizaron los 42 extractos modificados provenientes de las reacciones de bromación, sulfonilación e hidracinólisis, con sus respectivos testigos (7 extractos naturales), lo que da un total de 49 muestras analizadas.

Ninguna de las muestras evaluadas mostró actividad inhibitoria de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en las condiciones ensayadas, indicando que las reacciones de modificación aplicadas no producen cambios en los extractos naturales estudiados frente a esta propiedad biológica.

En la **Figura 23** se muestra la autografía de  $\beta$ -glucosidasa del extracto de *C. scolymus* macerado modificado con hidracina, mostrando resultado negativo (no se visualizan halos de color blanco). Los demás extractos mostraron idéntico resultado.



**Figura 23:** Ensayo de  $\beta$ -glucosidasa sobre CCD de fase normal sílica gel F<sub>254</sub> cuya fase móvil fue DCM:MeOH en proporciones 80:20, respectivamente. Se sembró: 1= Extracto de *C. scolymus* macerado, 2= Extracto de *C. scolymus* macerado modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. DCM, 3=Extracto de *C. scolymus* macerado modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. AcOEt, 4=Extracto de *C. scolymus* macerado modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. BuOH, 5= Extracto de *C. scolymus* reflujo, 6= Extracto de *C. scolymus* reflujo modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. DCM, 7=Extracto de *C. scolymus* reflujo modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. AcOEt, 8=Extracto de *C. scolymus* reflujo modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. BuOH.

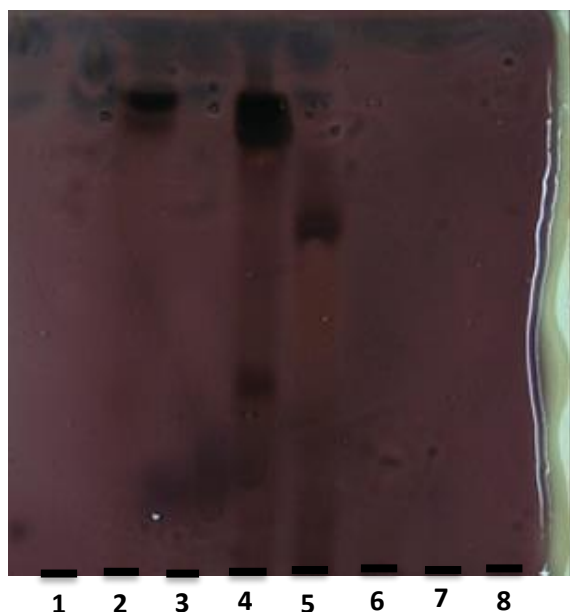
Los resultados obtenidos permiten concluir que las reacciones de modificación aplicadas en los extractos naturales no cambian las propiedades biomoleculares de los mismos frente a la enzima  $\beta$ -glucosidasa.

### 2.1.2 Actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa

Para comparar la respuesta de los extractos en cuanto a sus propiedades biomoleculares frente a acetilcolinesterasa, se analizaron los 49 extractos provenientes de las reacciones de bromación, sulfonilación e hidracinólisis con sus respectivos testigos. No se observó actividad inhibitoria en ninguna de las muestras, indicando que las reacciones de modificación aplicadas sobre los extractos naturales de partida no producen cambios en las propiedades de reconocimiento molecular de los extractos frente a acetilcolinesterasa.

En la **Figura 24** se muestra la autografía de acetilcolinesterasa del extracto de *C. scolymus* macerado modificado con hidracina, mostrando

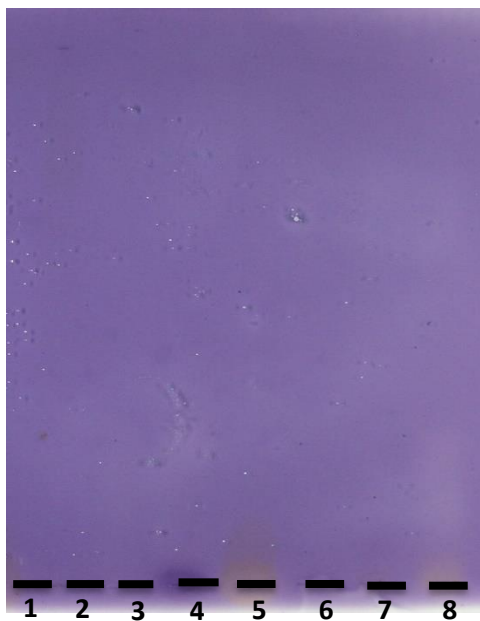
resultado negativo (no se visualizan halos de color blanco). Todos los extractos mostraron idéntico resultado.



**Figura 24:** Ensayo de acetilcolinesterasa sobre CCD de fase normal sílica gel F<sub>254</sub> cuya fase móvil fue DCM:MeOH en proporciones 80:20, respectivamente. Se sembró: 1= Extracto de *C. scolymus* macerado, 2= Extracto de *C. scolymus* macerado modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. DCM, 3=Extracto de *C. scolymus* macerado modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. AcOEt, 4=Extracto de *C. scolymus* macerado modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. BuOH, 5= Extracto de *C. scolymus* reflujo, 6= Extracto de *C. scolymus* reflujo modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. DCM, 7=Extracto de *C. scolymus* reflujo modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. AcOEt, 8=Extracto de *C. scolymus* reflujo modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. BuOH.

### 2.1.3 Actividad inhibitoria frente a la enzima xantina oxidasa

En la **Figura 25** se muestra la autografía de xantina oxidasa del extracto de *C. scolymus* macerado modificado con hidracina, mostrando resultado negativo (no se visualizan halos de color blanco). Todos los extractos modificados mostraron idéntico resultado.



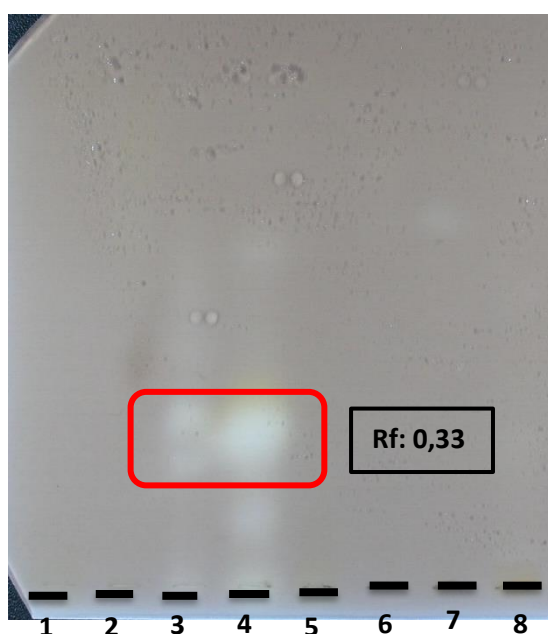
**Figura 25:** Ensayo de xantina oxidasa sobre CCD de fase normal sílica gel F<sub>254</sub> cuya fase móvil fue DCM:MeOH en proporciones 80:20, respectivamente. Se sembró: 1= Extracto de *C. scolymus* macerado, 2= Extracto de *C. scolymus* macerado modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. DCM, 3=Extracto de *C. scolymus* macerado modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. AcOEt, 4=Extracto de *C. scolymus* macerado modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. BuOH, 5= Extracto de *C. scolymus* reflujo, 6= Extracto de *C. scolymus* reflujo modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. DCM, 7=Extracto de *C. scolymus* reflujo modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. AcOEt, 8=Extracto de *C. scolymus* reflujo modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. BuOH.

La ausencia de actividad inhibitoria frente a xantina oxidasa en los extractos modificados permite concluir que ninguna de las reacciones aplicadas sobre los extractos naturales genera nuevos compuestos inhibidores de la enzima.

#### 2.1.4 Actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa

Como fue mencionado previamente, la tirosinasa o polifenol oxidasa (PPO) es una enzima bifuncional cuprífera ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales que cataliza la producción de melanina y otros pigmentos, por oxidación de L-tirosina. La autografía sobre placa delgada para detectar inhibidores de la enzima tirosinasa fue reportada por nuestro grupo y el ensayo consiste en depositar sobre un cromatograma desarrollado por CCD una solución que contiene una mezcla de la enzima, un agente gelificante (agar) y el sustrato, la L-tirosina. Una vez que se forma el gel se incuba la placa en estufa a 28°C. Después de unos minutos, el gel toma una coloración rosada pero los compuestos con actividad inhibitoria se observan como puntos claros.

Al desarrollar el bioensayo de tirosinasa, se encontró actividad biológica en los extractos de *C. scolymus* macerado y reflujo modificados con hidracina en la fracción BuOH (**Figura 26**).

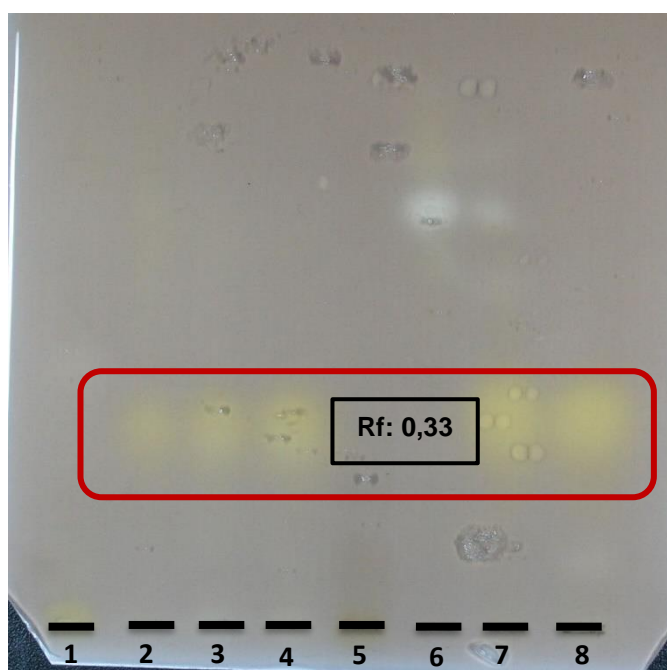


**Figura 2:** Ensayo de tirosinasa sobre CCD de fase normal sílica gel F<sub>254</sub> cuya fase móvil fue DCM:MeOH en proporciones 80:20, respectivamente. Se sembró: 1= Extracto de *C. scolymus* macerado, 2= Extracto de *C. scolymus* reflujo, 3=Extracto de *C. scolymus* macerado modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. BuOH, 4=Extracto de *C. scolymus* reflujo modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. BuOH, 5= Extracto de *C. scolymus* macerado modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. AcOEt, 6= Extracto de *C. scolymus* reflujo modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. AcOEt, 7=Extracto de *C. scolymus* macerado modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. DCM, 8=Extracto de *C. scolymus* reflujo modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> f. DCM.



La actividad no se detectó en los extractos naturales de *C. scolymus* macerado y reflujo. Esto nos llevó a inferir que los componentes que generan la inhibición de la enzima tirosinasa son productos de la modificación química con hidracina.

Los extractos de *A. lappa* y *P. boldus* modificados con  $N_2H_4 \cdot H_2O$  también resultaron activos. Los halos de actividad fueron detectados en la misma zona de Rf en la que se halló actividad para *C. scolymus* (Rf 0,33). Dicha actividad no se detectó en los extractos naturales de *A. lappa* y *P. boldus*, por lo que inferimos que los componentes que generan la inhibición de la enzima son productos de la modificación química con hidracina.



**Figura 27:** Ensayo de tirosinasa sobre CCD de fase normal sílica gel F<sub>254</sub> cuya fase móvil fue DCM:MeOH en proporciones 80:20, respectivamente. Se sembró: 1= Extracto de *A. lappa* macerado, 2= Extracto de *A. lappa* modificado f. DCM, 3=Extracto de *A. lappa* modificado f. AcOEt, 4=Extracto de *A. lappa* modificado f. BuOH, 5=Extracto de *P. boldus* macerado, 6= Extracto de *P. boldus* modificado f. DCM, 7=Extracto de *P. boldus* modificado f. AcOEt, 8=Extracto de *P. boldus* modificado f. BuOH

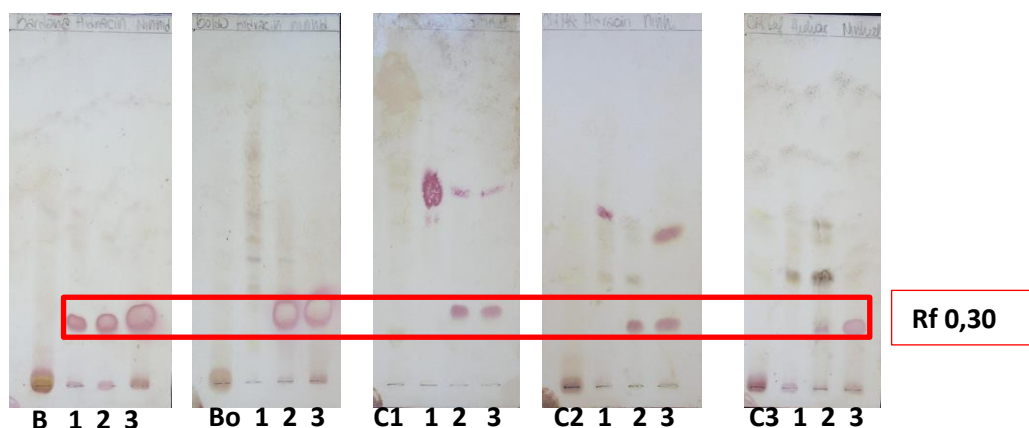
Resultó llamativo encontrar, entre extractos modificados de tres especies distintas, una zona de actividad biológica con idéntico Rf.

De acuerdo a la fitoquímica descrita para las tres especies hay ciertos compuestos que las mismas tienen en común y más aún, las estructuras de éstos presentan grupos funcionales aptos para reaccionar con hidracina monohidrato. Más adelante se discutirá en detalle este punto.

## 2.2 Aislamiento bioguiado de compuestos activos (Protocolo I)

Como se mencionó previamente, las modificaciones químicas se realizaron con 300 mg de extracto (masa suficiente para la caracterización cromatográfica y espectroscópica de la muestra y para la caracterización de bioactividad por ensayos autográficos). Sin embargo, esta cantidad es insuficiente para emprender un fraccionamiento bioguiado del extracto modificado para lo cual es necesario realizar el escalado de la reacción pasando de miligramos a gramos. Reacciones con hidracina, hidroxilamina y cloruro de bencensulfonilo se han llegado a escalar con 30 gramos de extracto sin observar grandes diferencias en los perfiles cromatográficos de los extractos modificados.<sup>92-94</sup> Dado que el escalado tiene como objetivo producir suficiente masa de extracto modificado como para aislar el compuesto o los compuestos activos previamente detectados por bioautografía, estas reacciones en mayor escala no sufren restricciones en cuanto a los métodos de purificación utilizados post reacción. En este caso no es necesario mantener como parte de la mezcla producto la mayor parte posible de componentes derivados del extracto original, sino que sólo interesa el compuesto (o los compuestos) activos generados y detectados previamente. Por lo tanto, en esta etapa se utilizaron métodos de fraccionamiento tradicionales como partición líquido-líquido con solventes de polaridad creciente, cromatografía en fase normal y cromatografía en fase reversa (CLAE analítica y preparativa). En todos los casos el aislamiento es guiado por el método autográfico que permitió la detección inicial del compuesto activo. Este proceso de purificación guiado por actividad biológica se realiza eficientemente en el caso de las autografías enzimáticas dado que los tiempos requeridos para analizar la actividad de las fracciones son muy cortos.

Durante el proceso de búsqueda y purificación del/los compuesto/s activo/s en tirosinasa observado/s en los extractos modificados con hidracina de *C. scolymus*, *P. boldus* y *A. lappa*, se descubrió la presencia de un compuesto que por CCD presentaba  $R_f = 0,3$  el cual también fue detectado en los extractos de *S. marianum* modificados con hidracina cuando los cromatogramas fueron revelados con ninhidrina (**Figura 28**).

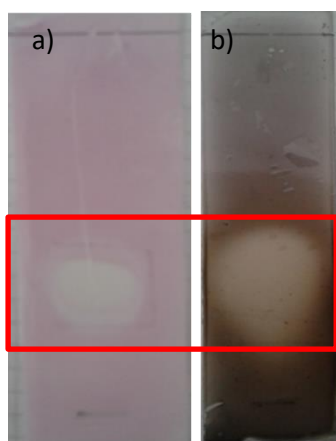


**Figura 28:** CCD de los extractos de partida de Bardana (B, *A. lappa*), Boldo (Bo, *P. boldus*) y Cardo mariano (C1, C2 y C3, *S. marianum*) y de los mismos modificados con hidracina monohidrato (1, 2, 3). FE: sílicagel GF<sub>254</sub> FM: DCM:MeOH (80:20). Revelador: ninhidrina + calor.

Este resultado indicaba la potencial presencia de al menos un compuesto común en los extractos modificados de las cuatro especies en estudio, el cual podía provenir de los extractos naturales de partida tras modificarse con hidracina o bien que el compuesto activo se podría generar luego de la modificación química durante el proceso de *work up*. Interesantemente para *S. marianum* la fitoquímica reportada, hasta nuestro grado de conocimiento, no describe compuestos comunes con las otras tres especies.

En este contexto, para abordar la factibilidad de las hipótesis postuladas inicialmente se evaluó la posibilidad de reacción entre AcOEt e hidracina monohidrato a temperatura ambiente, dado que AcOEt se utiliza durante el *work up* luego de la reacción de modificación y el compuesto activo común a todos los extractos podía generarse durante este paso.

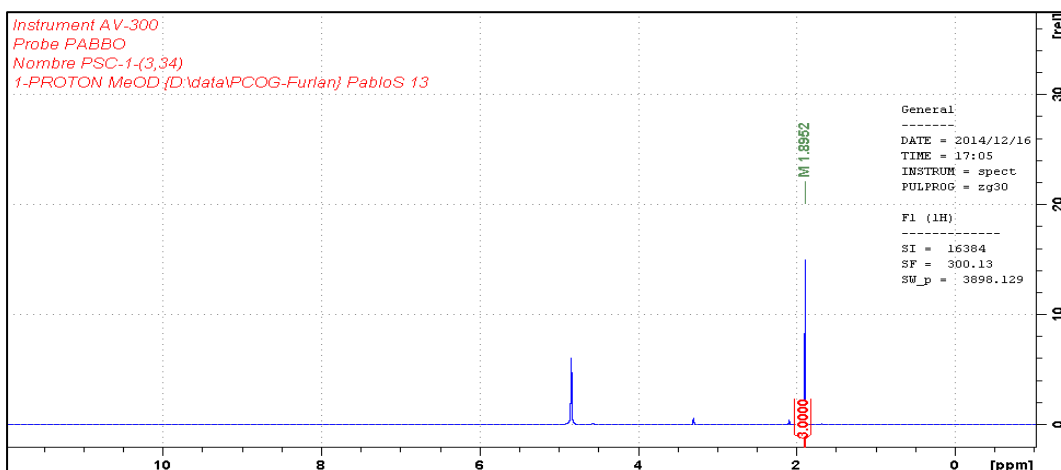
El AcOEt contiene un grupo éster que podría reaccionar con el excedente de hidracina tras hidracinólisis del grupo funcional. Al agitar una mezcla de AcOEt:NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (1:1), durante 2 horas y luego coevaporada con volúmenes de AcOEt, llevado hasta sequedad, se obtuvo un producto sólido. Se redisolvió dicho producto con AcOEt y fue sembrado y desarrollado por autografía en el bioensayo de tirosinasa, en condiciones idénticas a las previamente utilizadas. La autografía mostró actividad en la zona de Rf 0,33 (**Figura 29**).



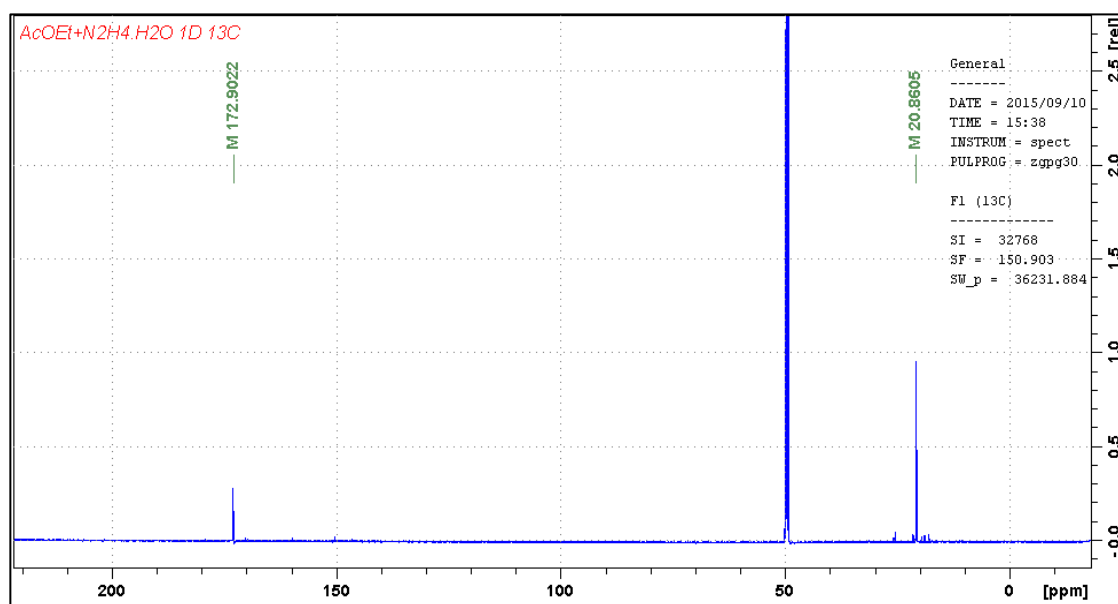
**Figura 29:** Ensayo con ninhidrina (a) y tirosinasa (b) sobre CCD de fase normal sílica gel F<sub>254</sub> cuya fase móvil fue DCM:MeOH en proporciones 80:20, respectivamente. Se sembró: fracción AcOEt proveniente de la modificación de AcOEt con hidracina en sendas placas.

### 2.2.1. Elucidación estructural del primer compuesto aislado activo

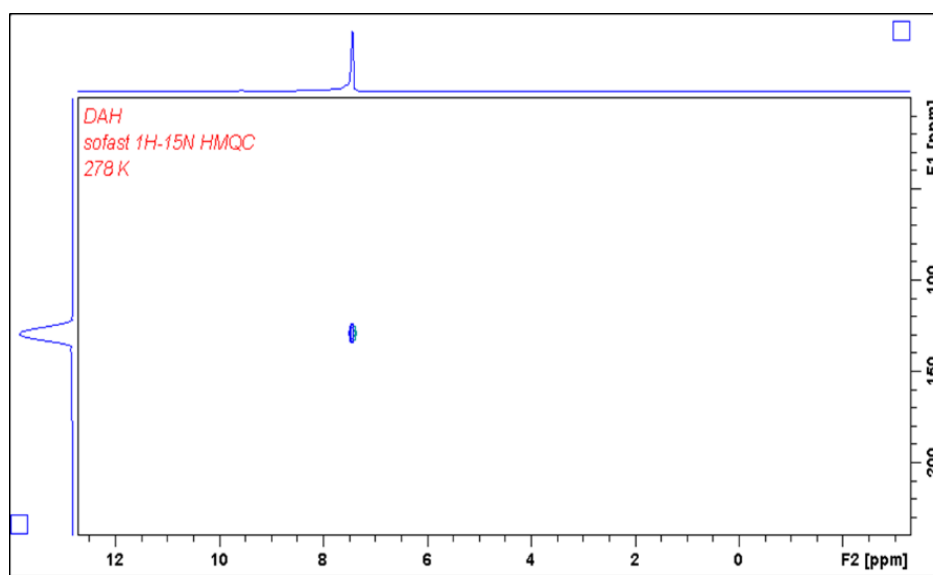
Para la elucidación estructural del compuesto activo se realizaron experimentos de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N (**Figuras 30-32**).



**Figura 30:** Experimento de RMN <sup>1</sup>H, sobre la muestra correspondiente a la reacción entre AcOEt e hidracina en MeOD.



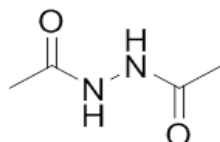
**Figura 31:** Experimento de RMN  $^{13}\text{C}$ , sobre la muestra correspondiente a la reacción entre AcOEt e hidracina en MeOD.



**Figura 32:** Experimento de RMN  $^{15}\text{N}$ -2D, sobre la muestra correspondiente a la reacción entre AcOEt e hidracina en MeOD.

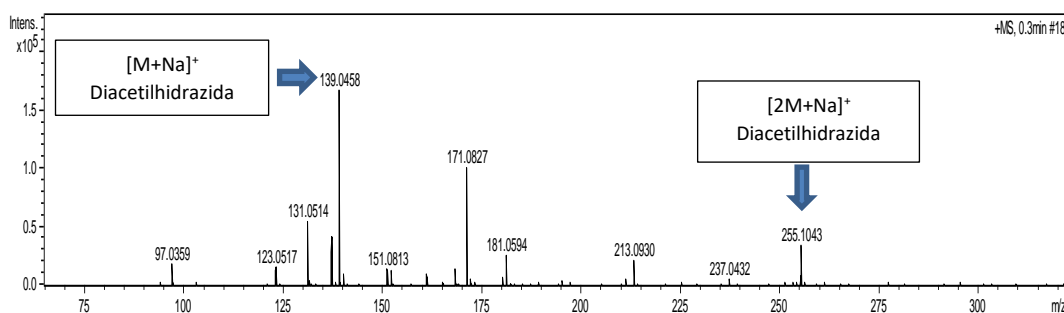
En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se detecta un singlete con desplazamiento químico 1,8952 ppm que integra para 3 protones (**Figura 30**), correspondiente a protones del tipo  $-\text{CH}_3$ . Las otras señales intensas corresponden a señales de solventes. El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  muestra

una señal con desplazamiento 20,8205 ppm correspondiente a carbono metílico y otra en 172,9022 ppm correspondiente a carbono carbonílico (**Figura 31**). En el experimento de RMN  $^{15}\text{N}$  en dos dimensiones se detecta una única señal (**Figura 32**), indicando que hay un solo tipo de N o bien que si hay dos N en la molécula los mismos son equivalentes. Estos resultados permiten inferir la estructura de una molécula simétrica sugiriendo la posible formación de diacetil hidrazina (**Figura 33**).



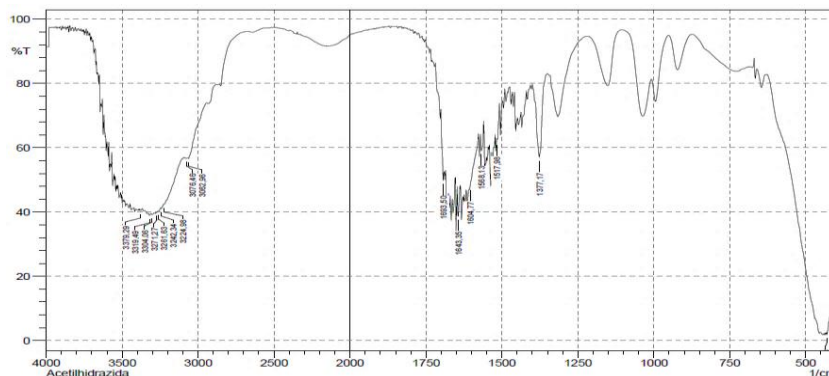
**Figura 33:** Estructura química de diacetil hidrazina.

Para confirmar este esqueleto molecular, experimentos de EM de alta resolución fueron desarrollados (**Figura 34**). Los espectros resultantes de la infusión directa de la muestra en solución metanólica e ionizada por electrospray en modo positivo, mostraron la señal  $m/z$  139,0458 de mayor intensidad. La masa exacta de diacetil hidrazina es 116,0458 para la fórmula molecular  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_2$ , comprobando que la señal más intensa corresponde al ión molecular  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . En el espectro también se observa la presencia de una señal de  $m/z$  171,0827 correspondiente al ion molecular solvatado  $[\text{M}+\text{MeOH}+\text{Na}]^+$  y la señal  $m/z$  255,1043 correspondiente al aducto  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$  de diacetil hidrazina (DAH).



**Figura 34:** Espectro masa correspondiente al producto de reacción entre AcOEt e hidracina, en modo de ionización positivo.

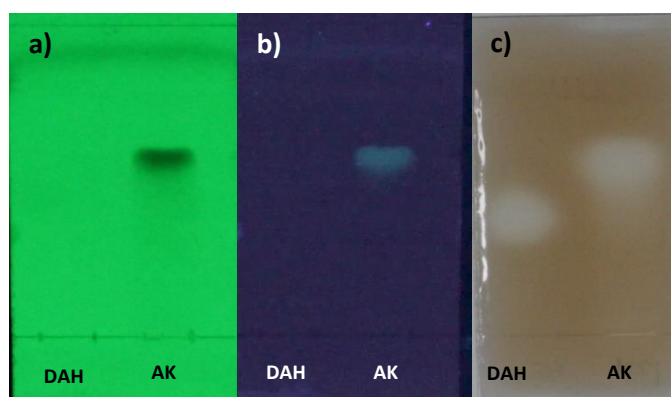
Finalmente, mediante experimentos IR se corroboró la ausencia de dos bandas típicas del grupo  $\text{NH}_2$  en la zona de  $3100$  a  $3500\text{ cm}^{-1}$  (N-H stretch, **Figura 35**).



**Figura 35:** Espectro de IR correspondiente al producto de reacción entre AcOEt e hidracina.

Si bien la monoacetil hidrazina es un compuesto con elevada citotoxicidad sobre el sistema nervioso central, causa enfermedades hepáticas y carcinogénesis,<sup>95</sup> DAH no tiene reportada actividad citotóxica resultando ser un compuesto interesante dado la actividad biológica encontrada frente a tirosinasa y a la facilidad de su síntesis.

La bioactividad de DAH frente a tirosinasa fue comparada cualitativamente por CCD con la del ácido kójico (AK), el cual es el inhibidor de referencia de la enzima tirosinasa. Este ensayo se realizó sembrando  $20\text{ }\mu\text{g}$  de DAH *versus*  $20\text{ }\mu\text{g}$  del ácido (**Figura 36**).



**Figura 36:** Revelado bajo luz UV 254nm (a), luz UV 365nm (b) y ensayo de tirosinasa (c) sobre CCD de fase normal sílica gel  $\text{F}_{254}$  cuya fase móvil fue DCM:MeOH en proporciones 80:20, respectivamente. Se sembró: DAH (diacetil hidrazina, AK (ácido kójico).

Los resultados obtenidos permiten inferir que DAH es un inhibidor de tirosinasa prometedor ya que a la misma cantidad de siembra que el inhibidor de referencia AK genera un halo de inhibición de similar tamaño. En consecuencia, a fin de cuantificar la actividad inhibitoria frente a la enzima tirosinasa se realizaron ensayos en microplaca, donde la  $CI_{50}$  de DAH resultó  $7,59 \mu M \pm 0,75 \mu M$ , es decir 1,56 veces más activo que el inhibidor de referencia ( $CI_{50}$  AK =  $11.97 \mu M \pm 0.75 \mu M$ ).

Debido a que DAH resultó ser un subproducto del proceso de modificación no proveniente de la modificación química de componentes del extracto natural, se propuso un nuevo protocolo para la reacción de modificación con hidracina en el que se elimina el lavado con AcOEt del *work up*. Todos los extractos naturales fueron entonces modificados con hidracina monohidrato siguiendo este nuevo protocolo de reacción. Esto se realizó con el fin de observar si había algún compuesto activo proveniente de los extractos modificados que hubiera quedado enmascarado con el producto de reacción entre hidracina y AcOEt.



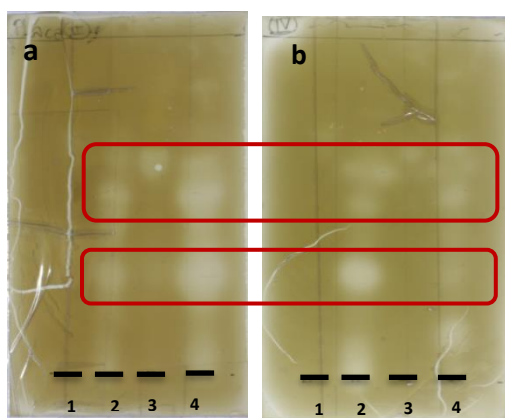


## CAPÍTULO III

### 3.1 Búsqueda de compuestos activos en los extractos modificados con hidracina monohidrato (Protocolo II)

La totalidad de los extractos naturales en estudio fueron modificados con hidracina monohidrato siguiendo el nuevo protocolo de modificación química, es decir, los extractos naturales se hicieron reaccionar con hidracina monohidrato y luego de la reacción se realizó el *work up* particionando el crudo de reacción con DCM y n-BuOH, es decir obviando el lavado con AcOEt. Posteriormente se procedió al análisis cromatográfico para evaluar cambios de composición y de bioactividad respecto a los extractos naturales de partida.

La CCD mostró diferencias en la composición química de los extractos y al realizar el ensayo de actividad frente a tirosinasa se encontró que para las sufracciones BuOH de los extractos de *C. scolymus* macerado y reflujo, *P. boldus* y *A. lappa* había actividad inhibitoria en varias zonas incluyendo nuevamente la zona de Rf 0,3 (**Figuras 37a y 37b**), mientras que *S. marianum* no presentó actividad inhibitoria en tirosinasa luego de aplicar el nuevo protocolo para esta reacción de modificación.



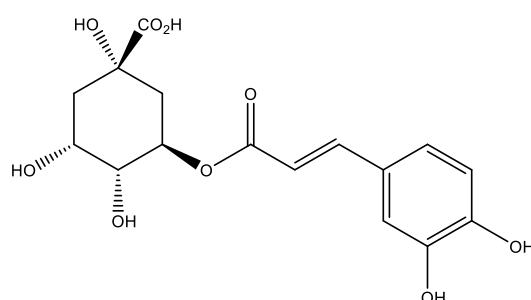
**Figura 37:** Ensayo de tirosinasa sobre CCD de fase normal sílica gel F<sub>254</sub> cuya fase móvil fue DCM:MeOH en proporciones 80:20, respectivamente. **a)** Se sembró: 1= Extracto de *C. scolymus* macerado f. DCM, 2= Extracto de *C. scolymus* macerado f. BuOH, 3=Extracto de *C. scolymus* reflujo f. DCM, 4=Extracto de *C. scolymus* reflujo f. BuOH. **b)** Se sembró: 1) *Arctium lappa* f. DCM, 2) *Arctium lappa* f. BuOH, 3) *Peumus boldus* f. DCM, 4) *Peumus boldus* f. BuOH.

Esto llevó a investigar la siguiente hipótesis previamente postulada, es decir, si las drogas de estas tres especies tienen compuestos en común que podrían ser modificados con hidracina, entonces sus productos son los responsables de la actividad tirosinasa.

En la literatura encontramos que existe al menos un componente común descrito en extractos de *C. scolymus*, *P. boldus* y *A. lappa*. Dicho compuesto es el ácido clorogénico.<sup>96-98</sup>

El ácido clorogénico está presente en casi todas las plantas superiores en las que juega el papel de responder al estrés medioambiental como por ejemplo, al desgarro de las hojas o de las flores o a los cortes que tengan lugar en la piel de la fruta. En general, la cantidad de este ácido presente en la mayoría de las plantas es muy pequeña como para afectar al ser humano cuando lo ingiere en la dieta, pero ocasionalmente se acumula en cantidades suficientes como para mostrar efectos fisiológicos. El ácido clorogénico pertenece a un grupo de compuestos fenólicos denominados ácidos hidroxicinámicos y resulta de la unión de una molécula de ácido quínico y una molécula derivada del ácido cinámico, el ácido cafeico. Junto a los ésteres del ácido quínico y ferúlico o *p*-cumárico, todos estos compuestos poseen acción antioxidante y antiinflamatoria y se denominan en conjunto ácidos clorogénicos.<sup>99,100</sup>

El ácido clorogénico, de acuerdo a la nomenclatura IUPAC es el ácido 5-cafeilquínico<sup>101</sup> (**Figura 39**) y su fuente principal es el café verde y también la alcachofa entre las hortalizas.<sup>102</sup>



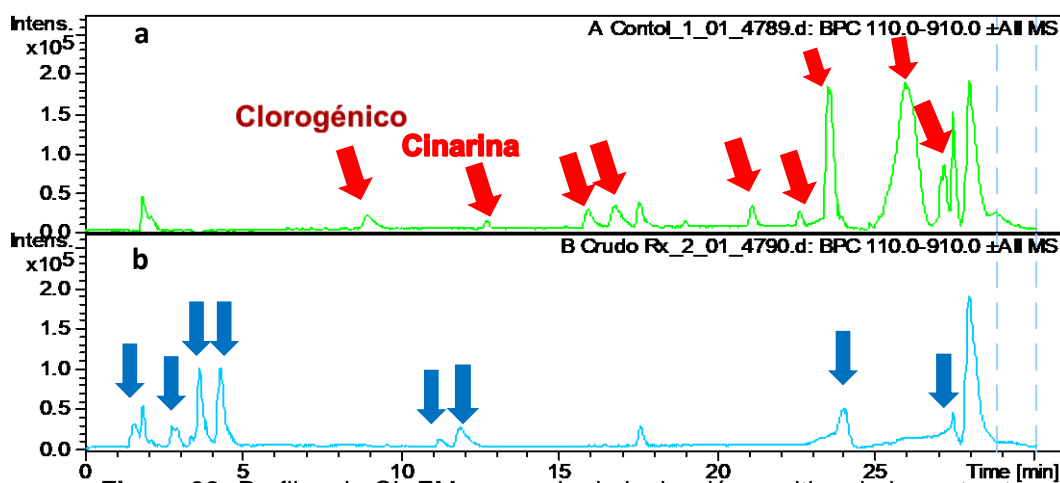
**Figura 39:** Estructura química del ácido clorogénico.

La alta diversidad química de las moléculas presentes en las plantas y en consecuencia en los extractos producidos a partir de ellas, sumado al hecho de desconocer la composición química exacta de estas mezclas, hace que la comparación de extractos naturales *versus* modificados resulte desafiante.

Como se mencionó anteriormente, dentro de las técnicas cromatográficas CL-UV-EM es muy utilizada para el análisis de extractos de origen vegetal imponiéndose como una combinación robusta que permite la identificación de cientos de metabolitos en mezcla. El

acoplamiento de técnicas de separación cromatográfica como CL a analizadores de masa por TDV (Tiempo de Vuelo), permite una correcta deconvolución de los picos provenientes de mezclas complejas debido a la alta velocidad de escaneo que presentan estos instrumentos. Esta tecnología fue utilizada para estudiar todos los extractos naturales y modificados con hidracina monohidrato.

Los cromatogramas de los extractos de *C. scolymus* cultivar Gauchito, natural vs modificado analizados por CL-EM, muestran claras diferencias de composición evidentes en sus perfiles cromatográficos resultantes (**Figura 38**).



**Figura 38:** Perfiles de CL-EM, en modo de ionización positivo de los extractos de *C. scolymus* var. Gauchito (a) Control y (b) modificado con hidracina monohidrato

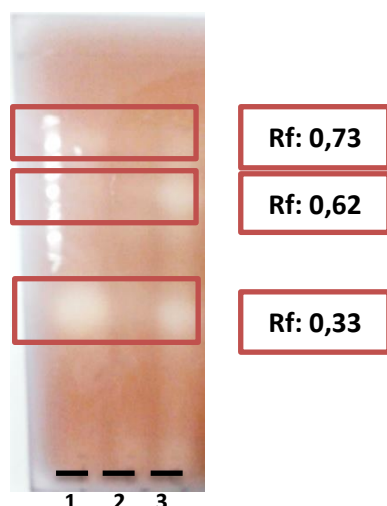
En el extracto natural de *C. scolymus* se detectó ácido clorogénico con señales de  $[M-H]^-$  en tiempo de retención 9 min y cinarina con señales de  $[M-H]^-$  en tiempo de retención 12,5 min, junto a derivados de luteolina, apigenina y otros compuestos no identificados (flechas rojas, **Figura 38a**). Los mencionados compuestos no fueron detectados en el extracto modificado (**Figura 38b**), mientras que nuevos compuestos fueron detectados en el perfil cromatográfico del extracto modificado (flechas azules, **Figura 38b**), ausentes en los extractos de partida (**Figura 38a**). Estos resultados muestran cambios sustanciales de composición en el extracto natural debido a la modificación química con  $N_2H_4 \cdot H_2O$ . Además, la presencia de nuevos picos con tiempos de retención reducidos en el perfil cromatográfico del extracto modificado (**Figura 38b**), indica que éste

contiene compuestos de naturaleza más polar que los presentes en el extracto control. Esto podría explicarse por la potencial incorporación de hidracina en compuestos del extracto sometido a la modificación, la cual es de naturaleza polar y en consecuencia podría aumentar la polaridad de los compuestos que reaccionaron con ella al formar por ejemplo acilhidrazinas. Uno de los cambios más interesantes observado en estos cromatogramas es la desaparición de los picos correspondientes al ácido clorogénico y a la cinarina, compuestos que debido a los grupos funcionales que contienen son susceptibles de reaccionar con hidracina. Ácido clorogénico y cinarina presentan una función éster apta para ser modificada con el reactivo utilizado. En este caso particular, a diferencia del éster sencillo presente en AcOEt previamente descrito, el carbonilo de la función éster es del tipo  $\alpha,\beta$  insaturado introduciendo otras posibles reacciones en paralelo y en consecuencia la generación de otros productos además de la potencial acilhidrazida.

Todos estos indicios nos condujeron a planificar la modificación química de ácido clorogénico puro con hidracina monohidrato.

### 3.2 Modificación química del ácido clorogénico

Para comprobar si la actividad inhibidora en tirosinasa proviene de la modificación química del ácido clorogénico presente en los extractos tras su reacción con hidracina monohidrato, se procedió a realizar la reacción de modificación partiendo de ácido clorogénico puro e  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1:1,5 equivalentes), utilizando las condiciones de reacción previamente aplicadas en los extractos y siguiendo el nuevo protocolo propuesto para el *work up* de la reacción. Una vez realizado el *work up*, se desarrolló el ensayo de actividad sobre tirosinasa sembrando también las subfracciones BuOH de los extractos modificados de *C. scolymus* refujo y macerado a fin de comparar los resultados obtenidos (**Figura 40**).



**Figura 40:** Ensayo de tirosinasa. CCD en fase normal sílica gel F<sub>254</sub>. Fase móvil: DCM:MeOH (80:20). Siembra: 1= Ácido clorogénico modificado con hidracina fracción BuOH, 2= Extracto de *C. scolymus* macerado modificado con hidracina fracción BuOH, 3=Extracto de *C. scolymus* reflujo modificado con hidracina fracción BuOH.

La bioautografía de tirosinasa mostró que al menos tres productos resultantes de la modificación del ácido clorogénico inhiben a la enzima (**Figura 40**, calle 1); estos productos, a la vez, coinciden en Rf con el de los componentes activos de los extractos modificados de *C. scolymus* macerado y reflujo. Estos resultados condujeron a comenzar con la etapa de aislamiento y purificación de los componentes responsables de la inhibición.

### 3.2.1. Aislamiento y purificación de los compuestos activos provenientes de la modificación de ácido clorogénico con hidracina monohidrato

Diferentes experimentos de CCD y CLAE bioguiados con tirosinasa fueron realizados en escala analítica y preparativa, en fase normal y en fase reversa, a fin de separar y aislar los productos químicamente modificados provenientes de la reacción entre ácido clorogénico e hidracina. Al finalizar cada uno de los experimentos mencionados, la masa activa obtenida era muy pequeña y no estaba pura, es decir que no correspondía a un único compuesto.

Con el fin de indagar posibles sucesos de descomposición en las masas activas sobre tirosinasa, en particular cuando la misma estaba en contacto con la sílica empleada durante las etapas de purificación, se realizó CCD bidimensional y posteriormente el ensayo de tirosinasa sobre el cromatograma (**Figura 41**).



**Figura 41:** Ensayo de tirosinasa sobre CCD bidimensional, de fase normal sílica gel F<sub>254</sub> cuya fase móvil fue DCM:MeOH en proporciones 80:20 en ambas dimensiones. Se sembró: Ácido clorogénico modificado con hidracina fracción BuOH

Los resultados obtenidos permitieron confirmar que los compuestos modificados activos no se descomponen con la sílica y conservan su actividad sobre tirosinasa. En consecuencia, se procedió a escalar la reacción de modificación del ácido clorogénico (51,2 mg) y a realizar la purificación y aislamiento de compuestos activos de la subfracción BuOH (12 mg de la fracción BuOH), por cromatografía en columna (CC) de acuerdo a las condiciones descritas en Materiales y Métodos **Sección 5.9**. Luego de sembrar 12 mg de la subfracción BuOH activa se obtuvieron 98 eluatos. Los mismos fueron analizados por CCD con revelado químico y biológico a partir de lo cual se reconstituyeron 5 subfracciones de columna (S1:1,5 mg, S2:2,3mg, S3:1.4mg, S4:1.1mg y S5:1.8mg), las cuales fueron desarrolladas por bioautografía de tirosinasa en orden creciente de polaridad (**Figura 42**).

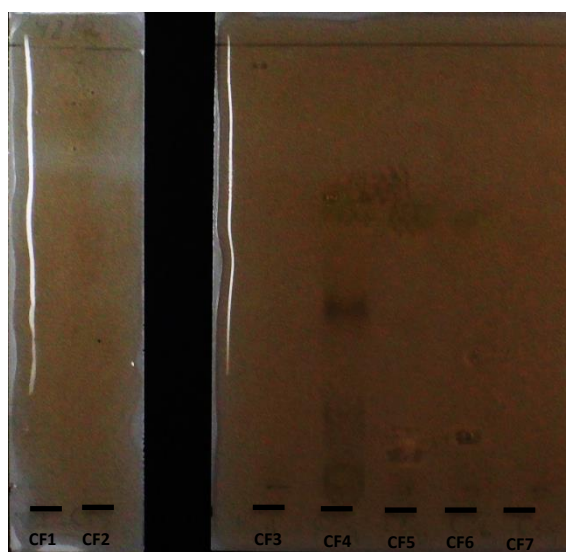


**Figura 42:** Ensayo de tirosinasa sobre CCD, de fase normal sílica gel F<sub>254</sub> cuya fase móvil fue DCM:MeOH:formico en proporciones 90:5:5. Se sembraron las 5 subfracciones en orden de polaridad creciente (S1, S2, S3, S4 y S5, respectivamente).



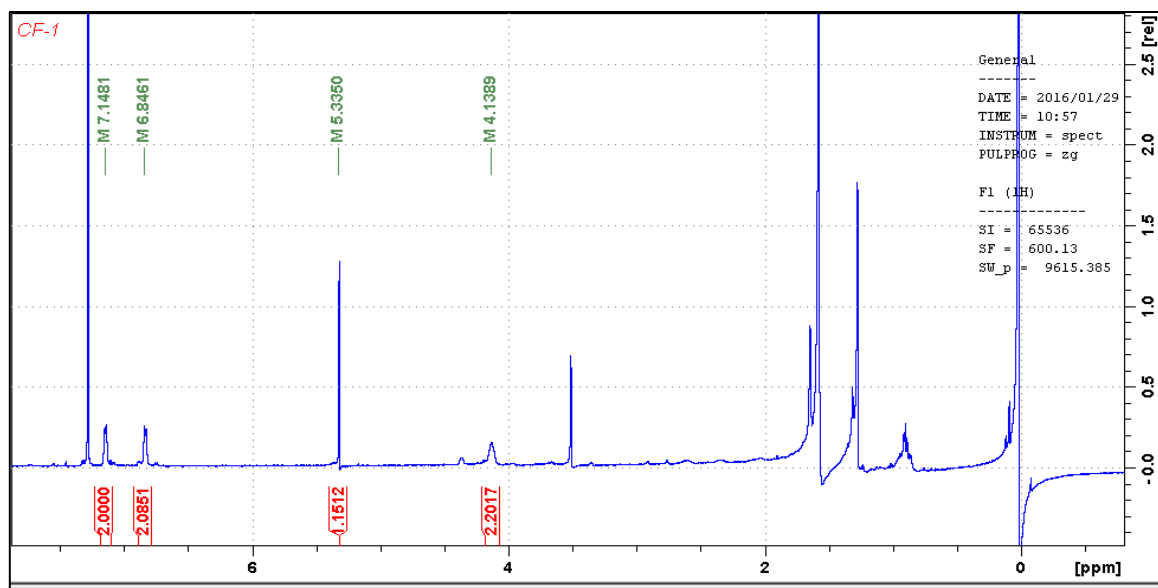
La subfracción S1 contenía tres compuestos activos de interés, los cuales presentan valores de  $R_f$  más altos que los anteriormente encontrados dado el cambio de fase móvil empleada en este experimento. Sin embargo, bajo las condiciones cromatográficas desarrolladas por CC evidentemente no se logró la separación y aislamiento de los compuestos puros activos. Dada la poca cantidad de masa de S1 (1,5 mg), la misma no pudo ser repurificada. Por consiguiente, se diagramó un nuevo escalado de la reacción de hidracinólisis sobre el ácido clorogénico y se modificaron las condiciones cromatográficas para la separación y aislamiento por CC.

Ante el nuevo escalado de la reacción de modificación (para más detalle ver Materiales y Métodos, **Sección 5.9.2**), se obtuvieron 16,4 mg de subfracción BuOH activa. Al aplicar las nuevas condiciones de CC, con solventes y mezclas de solventes de polaridad creciente, comenzando con DCM 100% y haciéndola prácticamente isocrática para luego seguir con las siguientes proporciones de DCM:MeOH con el agregado de entre 1 y 2 volúmenes muertos en proporciones 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 90:10, 80:20 y 70:30, se obtuvieron 167 eluatos. Luego de que éstos fueran analizados por CCD con revelado químico y biológico, se seleccionaron 7 nuevas subfracciones (CF1: 2,6 mg; CF2: 1,9 mg; CF3: 1mg; CF4: 0,9 mg; CF5: 0,8 mg; CF6: 1,3 mg; CF7: 1,1 mg) encontrando actividad tirosinasa en las dos subfracciones más apolares CF1 y CF2 (**Figura 43**).

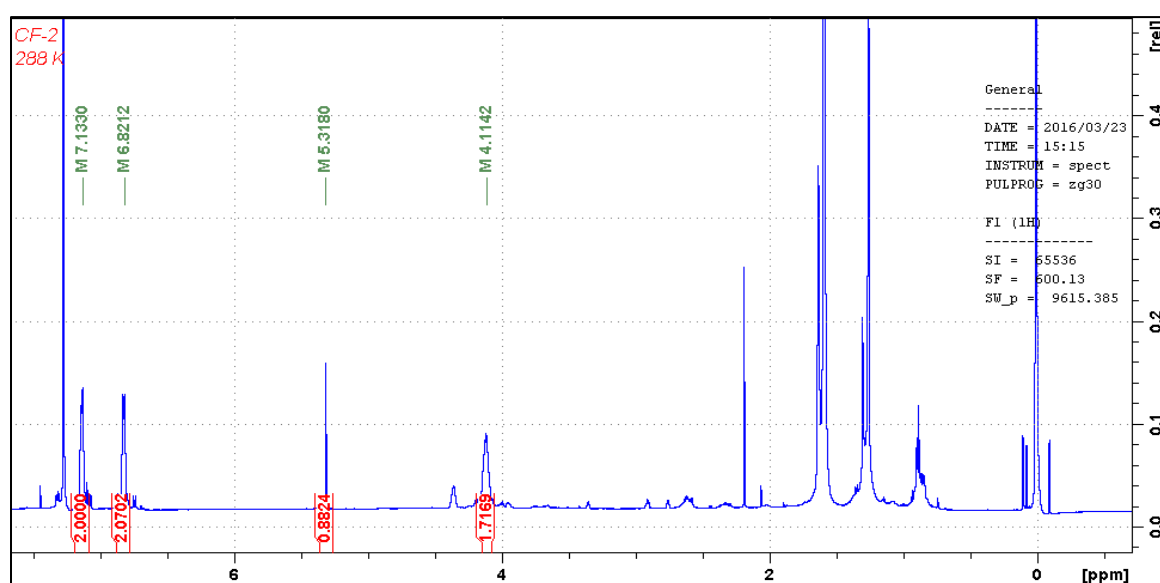


**Figura 43:** Ensayo de tirosinasa. CCD en fase normal sílica gel F<sub>254</sub>. Fase móvil DCM:MeOH en proporciones 80:20. Se sembraron las 7 subfracciones en orden de polaridad creciente (CF1, CF2, CF3, CF4 y CF5, CF6, CF7 respectivamente).

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de las subfracciones CF1 y CF2 (**Figuras 44 y 45**) mostraron que ambas muestras estaban aún impuras. Aun así, los espectros fueron analizados detectando dos posibles señales de protones aromáticos con desplazamientos 7,1481 y 6,8461 ppm, cada una de las cuales integraba para dos H tomando como referencia para la integración la señal del singlete detectado en 5,3350 ppm considerada para un único protón. Este resultado sugería la presencia de un anillo aromático di-sustituido en posición *para*.



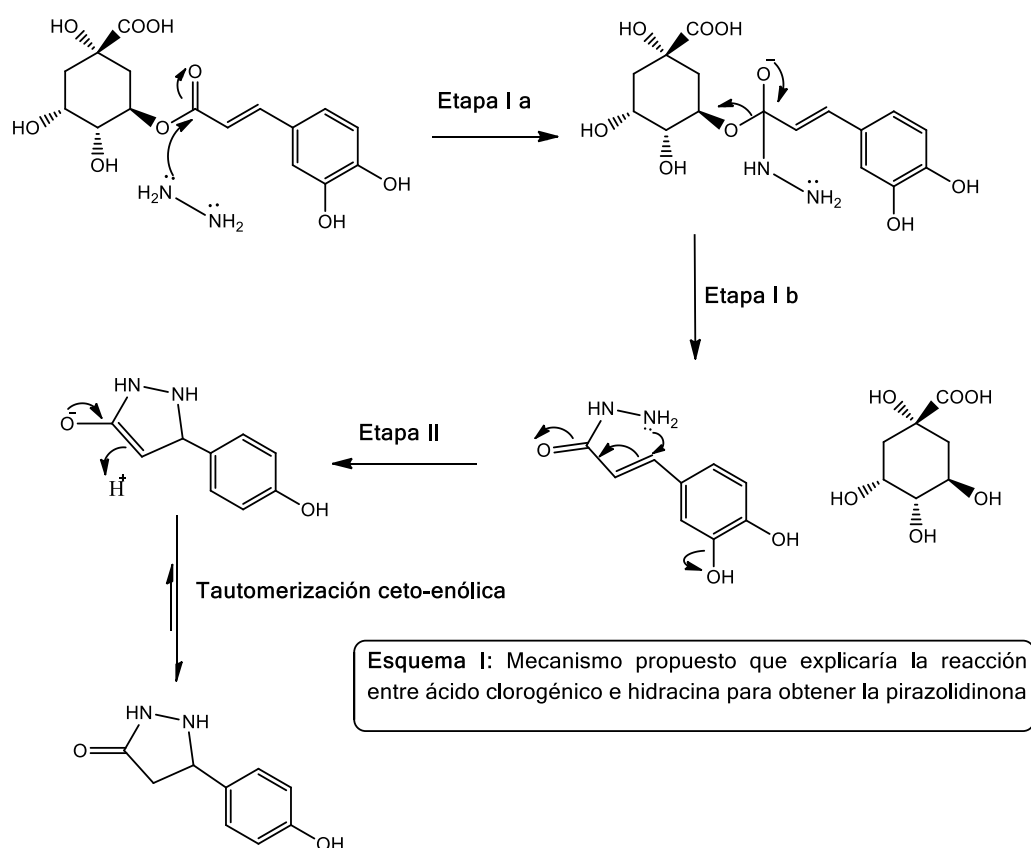
**Figura 44:** Experimento de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción CF1 en  $\text{CDCl}_3$



**Figura 45:** Experimento de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción CF2 disuelta en  $\text{CDCl}_3$

Si estas señales corresponderían a un compuesto derivado del ácido clorogénico o de la porción de ácido cafeico contenida en el mismo, uno de los hidroxilos sustituyentes del anillo debería perderse durante la reacción con hidracina para dar el tipo de sustitución antes descrita, para el potencial anillo aromático presente en el activo frente a tirosinasa y resultante del análisis de los espectros de RMN obtenidos. Si bien existen algunos datos experimentales que revelan pérdida de -OH en anillos fenólicos cuando se utiliza hidracina, no se sabe a partir de qué mecanismo ocurre la eliminación.<sup>103</sup>

En este trabajo de Tesis propusimos que un posible primer mecanismo de ataque de la hidracina ocurriría sobre el carbono carbonílico del éster del ácido clorogénico (**Esquema 1, Etapa I a**), a partir de una adición-eliminación sobre dicho carbonilo, liberando el alcóxido correspondiente al ácido quínico (**Esquema 1, Etapa I b**), como una primer etapa de reacción sobre el grupo carbonilo de un éster a partir de una hidracinólisis, ya que el nucleófilo es la hidracina.<sup>104</sup> El segundo átomo de nitrógeno de la acilhidrazida generada, al ser nucleófilo también, puede atacar el doble enlace  $\alpha,\beta$ -insaturado vecino (**Esquema 1, Etapa II**), pudiendo producirse un reordenamiento y generación de un ciclo que contiene a los dos átomos de nitrógeno. Hay evidencias en nuestro grupo de este tipo de reordenamientos cuando la hidracina reacciona con flavonas.<sup>105</sup> Estos posibles mecanismos darían como resultado un compuesto del tipo pirazolidinona derivada del ácido clorogénico.



Es oportuno mencionar que en la literatura, si bien son muy pocas las citas encontradas, se describe la síntesis de pirazolidinonas a partir de derivados de ácido cinámico.<sup>106,107</sup> Sin embargo, hasta el mayor grado de nuestro conocimiento y búsquedas realizadas, no hay descripción encontrada para la síntesis de pirazolidinonas a partir de derivados del ácido cafeico, donde la porción catecol puede jugar un rol fundamental en la generación de otras posibles reacciones.

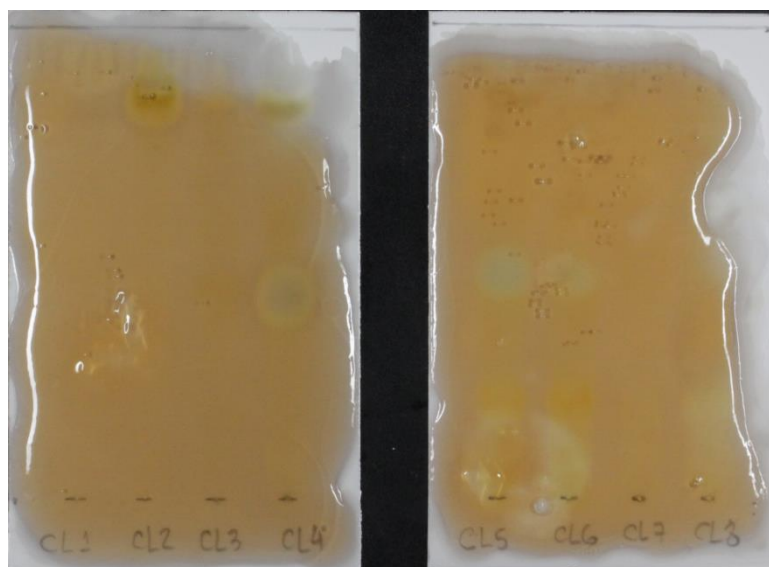
### 3.2.2. Generación de una potencial pirazolidinona y otros derivados a partir de la modificación química de ácido clorogénico con hidracina monohidrato

En esta etapa, se procedió a modificar nuevamente el ácido clorogénico con hidracina monohidrato. Luego del *work up* se obtuvieron dos fracciones, una clorofórmica y otra butanólica, sobre las cuales se realizó el ensayo de tirosinasa para evaluar la presencia de los activos previamente detectados (**Figura 46**).



**Figura 46:** Ensayo de tirosinasa sobre CCD. Fase normal (sílica gel F<sub>254</sub>). Fase móvil: DCM:MeOH (90:10). Se sembraron las 2 fracciones en orden de polaridad creciente (clorofórmica y butanólica, respectivamente).

Se halló actividad inhibitoria sobre tirosinasa en la fracción butanólica, en zonas de Rf 0,38 y 0,56. A continuación se hicieron pruebas de fases móviles para lograr separar los activos por CC. Una vez que se llevó a cabo la CC, se reunieron 8 subfracciones (CL1-CL8) que fueron evaluadas por el ensayo de tirosinasa (**Figura 47**).



**Figura 47:** Ensayo de tirosinasa sobre CCD. Fase normal (sílica gel F<sub>254</sub>). Fase móvil: DCM:MeOH (80:20). Se sembraron las 8 subfracciones en orden de polaridad creciente (CL1, CL2, CL3, CL4 y CL5, CL6, CL7 y CL8, respectivamente).

Al analizar las bioautografías resultantes, se observó actividad en las subfracciones CL4 a CL6, de las cuales se recuperó muy poca masa (CL4: 1 mg, CL5: 0,8 mg, CL6: 1,7 mg) estando las mismas impuras.

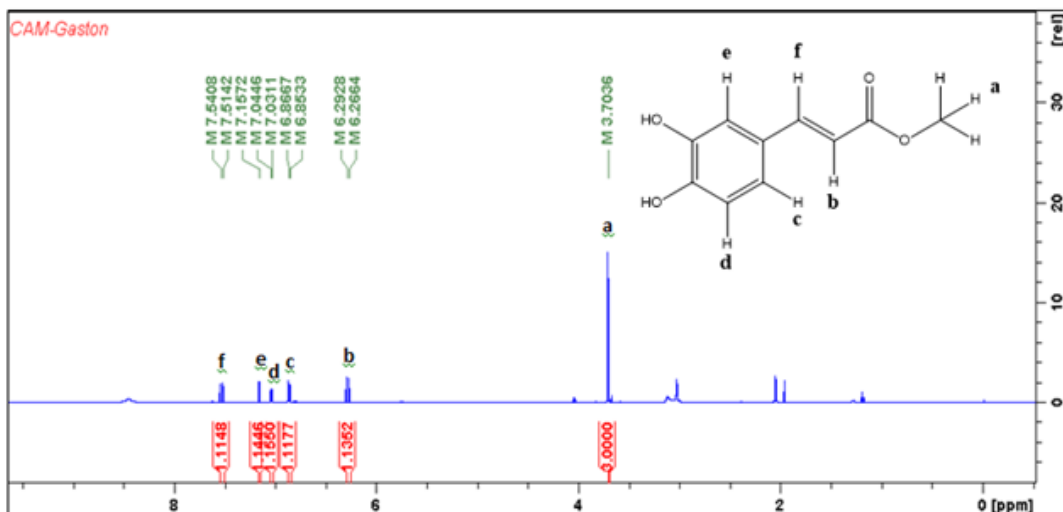
Se decidió realizar la reacción de modificación nuevamente, aumentando hasta 10 equivalentes el agregado de hidracina por equivalente de ácido clorogénico y manteniendo las restantes condiciones de reacción. Al aumentar el número de equivalentes de hidracina se pretendía lograr que la reacción fuese cuantitativa. Sin embargo, una vez realizado el *work up*, la reacción no resultó cuantitativa y al realizar el ensayo de tirosinasa con las fracciones DCM y BuOH obtenidas, el resultado fue negativo. De este experimento se pudo concluir que la cantidad de hidracina utilizada en la reacción de modificación debe ser equivalente a equivalente con el clorogénico empleado a fin de generar los compuestos responsables de la actividad frente a tirosinasa.

Debido a la dificultad de purificar y aislar el/los compuestos provenientes de la modificación de ácido clorogénico con hidracina y dado que las pirazolidinonas se pueden sintetizar a partir de ésteres del ácido cinámico,<sup>108</sup> se planificó generar la potencial pirazolidinona proveniente del clorogénico a partir del éster metílico del ácido cafeico.

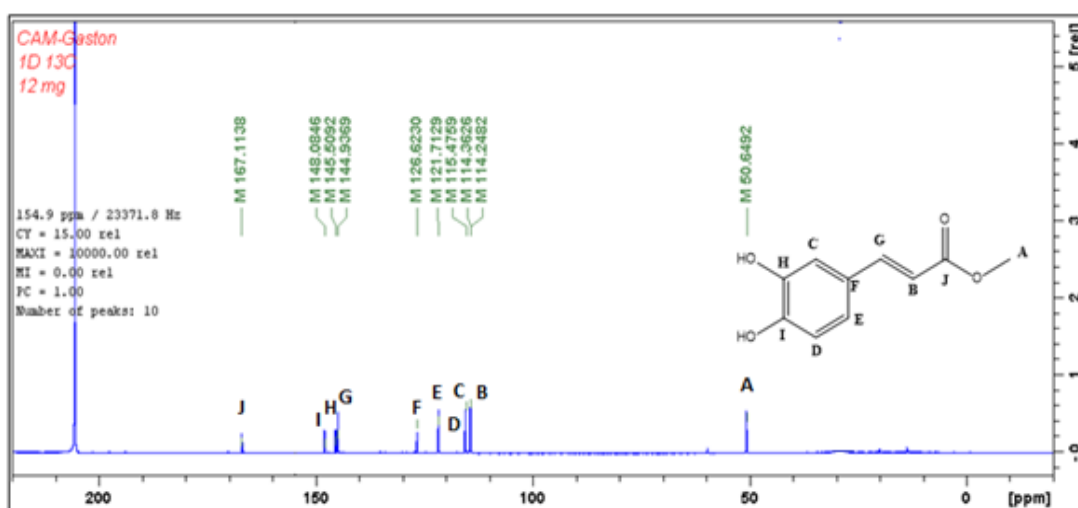
### 3.2.3 Síntesis de cafeato de metilo y posterior modificación química con hidracina monohidrato

Debido a que el ácido clorogénico es producto de esterificación entre el ácido cafeico y quínico, se planteó esterificar ácido cafeico con metanol para obtener el correspondiente éster metílico y así modificarlo con hidracina. La preparación del éster se hizo siguiendo datos bibliográficos.<sup>109</sup> El rendimiento de la reacción fue de 90,3%.

Mediante experimentos de RMN de <sup>1</sup>H (**Figura 48**) y <sup>13</sup>C (**Figura 49**), se corroboró la obtención de cafeato de metilo a partir de ácido cafeico.



**Figura 48:** Experimento de RMN  $^1\text{H}$ , sobre la muestra correspondiente a cafeoato de metilo en acetona $_{d6}$



**Figura 49:** Experimento de RMN  $^{13}\text{C}$ , sobre la muestra correspondiente a cafeoato de metilo en acetona $_{d6}$ .

Habiendo obtenido el éster metílico con un grado de pureza aceptable, se realizó la reacción de modificación química con hidracina monohidrato, utilizando 1,5 equivalentes de hidracina por cada equivalente del éster (200 mg, 1 miliequivalente). Una vez finalizado el *work up*, se desarrolló el bioensayo de tirosinasa sembrando las fracciones DCM y BuOH con el fin de observar si se reproducía la actividad anteriormente detectada en el ácido clorogénico modificado (**Figura 50**).



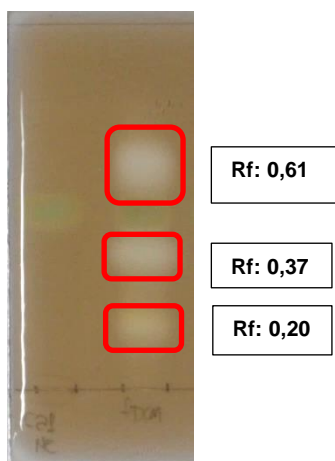
**Figura 50:** Ensayo de tirosinasa sobre CCD, fase normal sílica gel F<sub>254</sub>. Fase móvil DCM:MeOH en proporciones 80:20. Se sembraron el cafeato de metilo puro, la f. DCM y BuOH, respectivamente, éstas últimas provenientes del *work up* de la reacción entre cafeato de metilo e hidracina).

Los resultados indican bioactividad sobre tirosinasa en ambas fracciones, DCM y BuOH, donde el compuesto más apolar y de mayor R<sub>f</sub> se encuentra en la fracción DCM mientras que el mas polar y de menor R<sub>f</sub> se encuentra en la fracción BuOH. La masa recuperada en la fracción DCM fue 3,4mg con un rendimiento del 1,7% mientras que la fracción BuOH fue 13,5mg con un rendimiento del 6,8%.

Estos resultados permiten concluir que la porción cafeoil del ácido clorogénico está comprometida en la reacción de modificación, ya que al reaccionar cafeato de metilo con hidracina se vuelve a recuperar la actividad frente a tirosinasa aproximadamente en la misma zona de R<sub>f</sub> antes observada.

El ensayo de tirosinasa se repitió disminuyendo la polaridad de la FM, esta vez utilizando un sistema de solvente DCM:MeOH en proporciones 90:10 (**Figura 51**), a fin de mejorar la resolución de la fracción DCM.

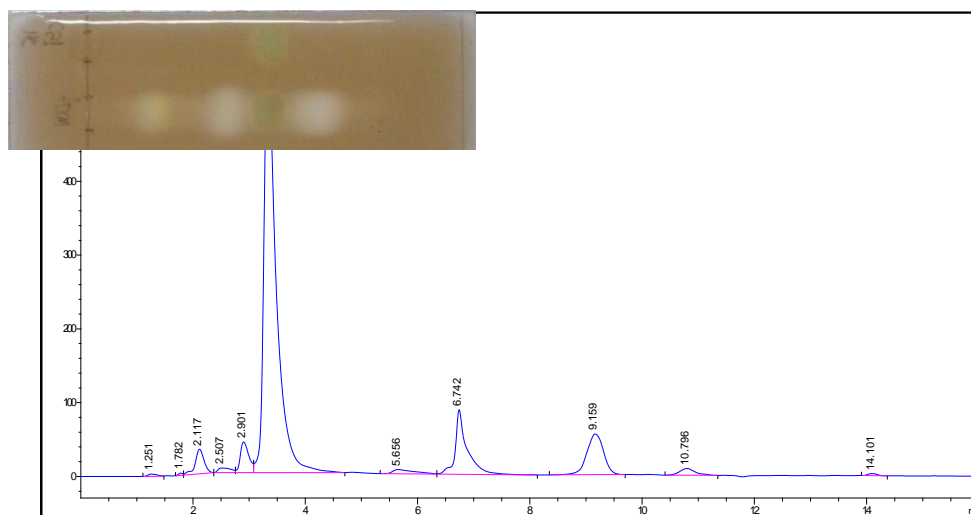




**Figura 51:** Ensayo de tirosinasa sobre CCD. Fase normal (sílica gel F<sub>254</sub>). Fase móvil: DCM:MeOH (90:10). Se sembraron el cafeato de metilo puro y la f. DCM, respectivamente, ésta última proveniente del *work up* de la reacción entre cafeato de metilo e hidracina.

Bajo estas condiciones cromatográficas la fracción DCM mostró tres compuestos activos. A fin de separarlos se buscaron condiciones adecuadas por CLAE analítica en fase reversa para luego replicarlas en CLAE preparativa.

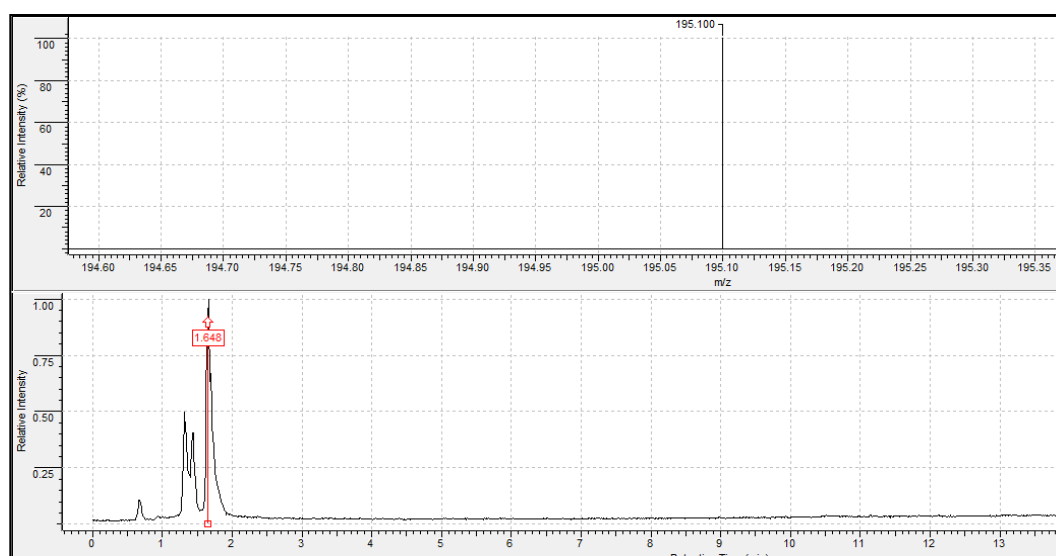
El cromatograma obtenido por CLAE (**Figura 52**), mostró un perfil de compuestos complementario al encontrado en la autografía de tirosinasa en fase normal.



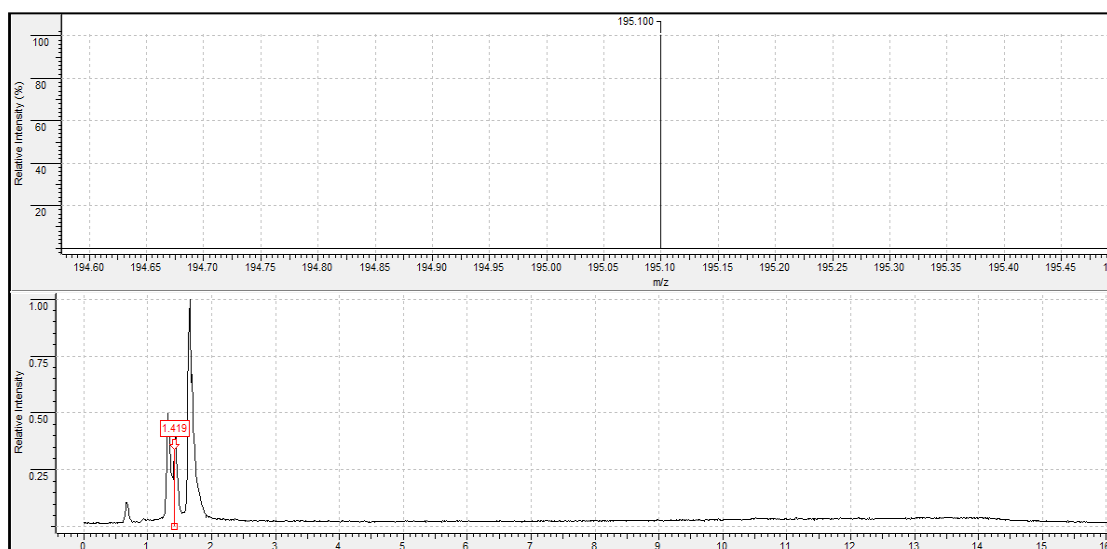
**Figura 52:** Perfil cromatográfico obtenido por CLAE-UV a 290 nm de la f DCM proveniente del *work up* de la reacción entre cafeato de metilo e hidracina, mostrando su contraste con la autografía de tirosinasa desarrollada con la misma f DCM.

El análisis de los cromatogramas de la Figura 52 permitió establecer una relación entre los picos obtenidos por CLAE-UV y los halos de la bioautografía en CCD, dado que la fracción DCM proveniente del work up post reacción cafeato de metilo:hidracina mostraba la aparición de compuestos potencialmente modificados de menor y de mayor polaridad que el cafeato de metilo.

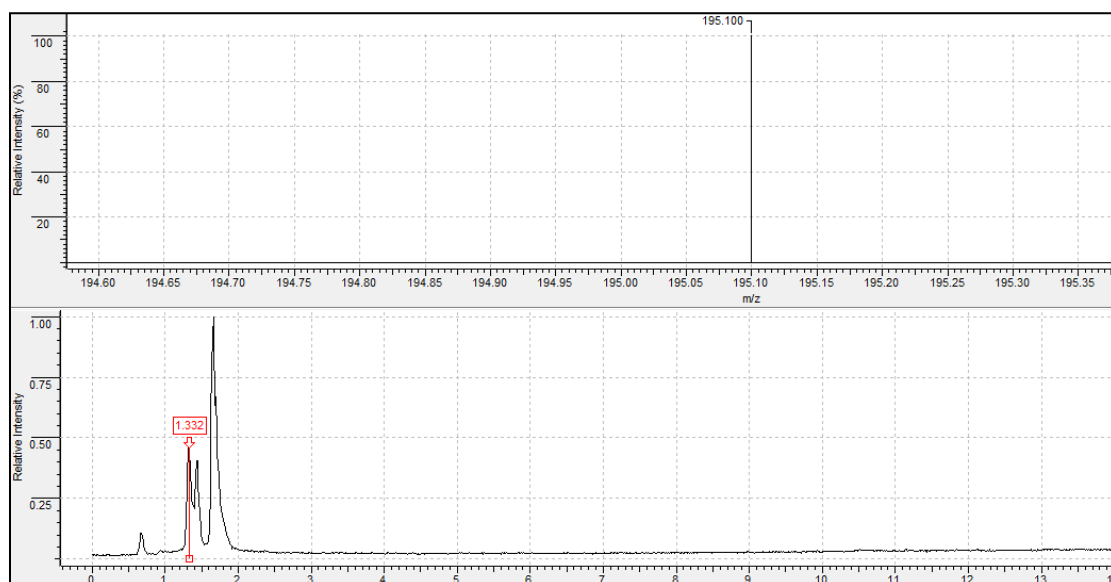
Posteriormente se realizaron experimentos de CLAE-EM aplicando condiciones similares a las utilizadas por CLAE-UV (Ver Materiales y Métodos, **Sección 5.12**). Los resultados mostraron tres picos correspondientes al cafeato de metilo de partida y sus potenciales productos de modificación con hidracina, con señales de  $m/z$  195,10 en modo de ionización positivo. Estos compuestos aparecieron con  $t_R$  1,33 min, 1,42 min y 1,65 min (**Figuras 53-55**), mientras que en modo de ionización negativo los mencionados picos mostraron señales de  $m/z$  193,20 (**Figuras 56-58**).



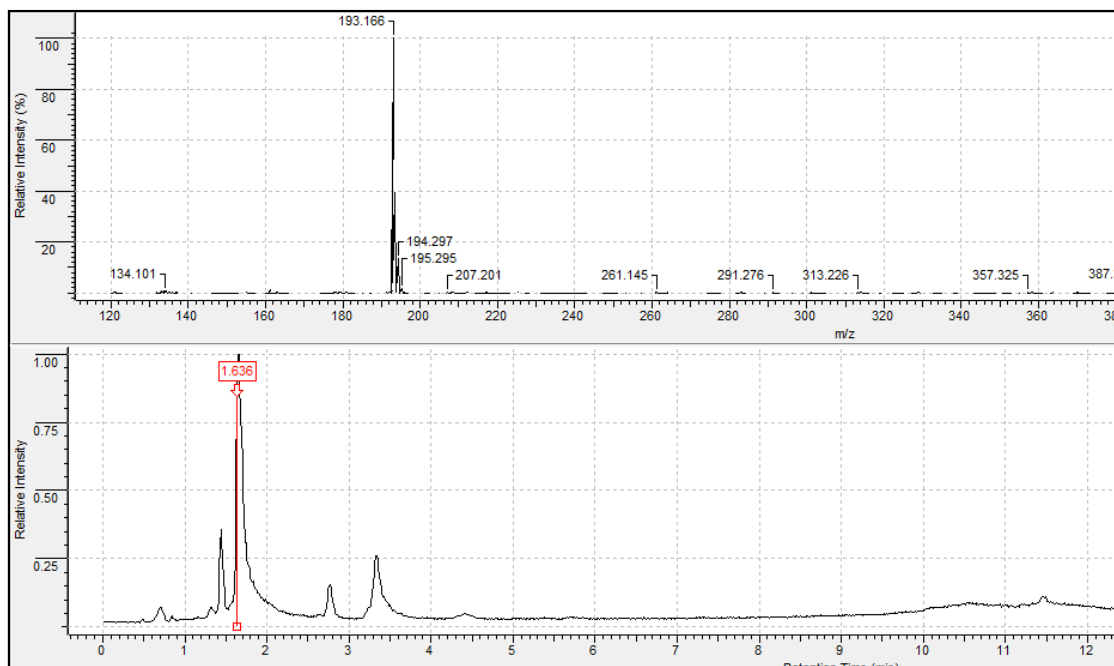
**Figura 53:** Señal de  $m/z$  195,100 (arriba) correspondiente al pico de  $t_R$  1,648 min (abajo) del cromatograma de la fracción DCM, proveniente de la modificación química de cafeato de metilo con hidracina, obtenido por CLAE-EM, fase reversa, modo de ionización positivo.



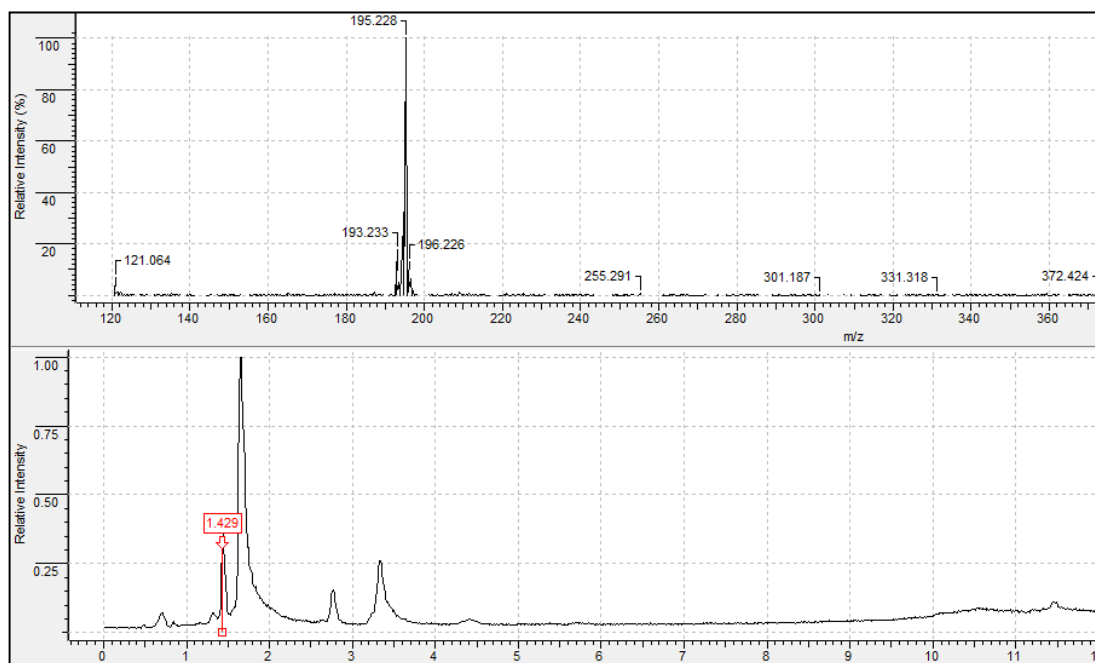
**Figura 54:** Señal de m/z 195,100 (arriba) correspondiente al pico de tR 1,419 min (abajo) del cromatograma de la fracción DCM proveniente de la modificación química de cafeato de metilo con hidracina, obtenido por CLAE-EM, fase reversa, modo de ionización positivo.



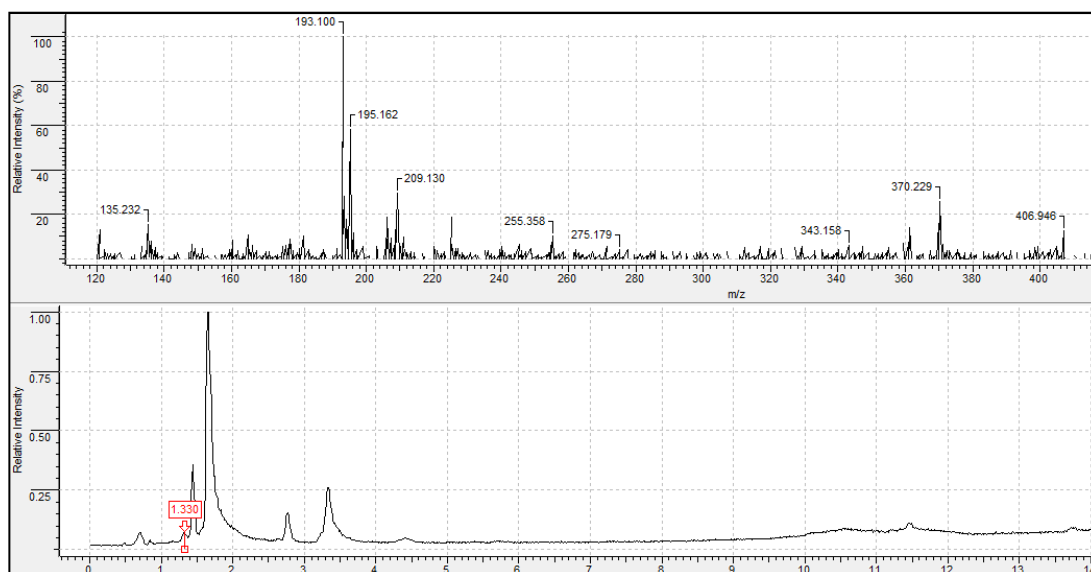
**Figura 55:** Señal de m/z 195,100 (arriba) correspondiente al pico de tR 1,332 min (abajo) del cromatograma de la fracción DCM proveniente de la modificación química de cafeato de metilo con hidracina, obtenido por CLAE-EM, fase reversa, modo de ionización positivo.



**Figura 56:** Señal de m/z 193,166 (arriba) para el pico de tR 1,64 min (abajo) del cromatograma de la fracción DCM proveniente de la modificación química de cafeato de metilo con hidracina, obtenido por CLAE-EM, fase reversa, modo de ionización negativo.

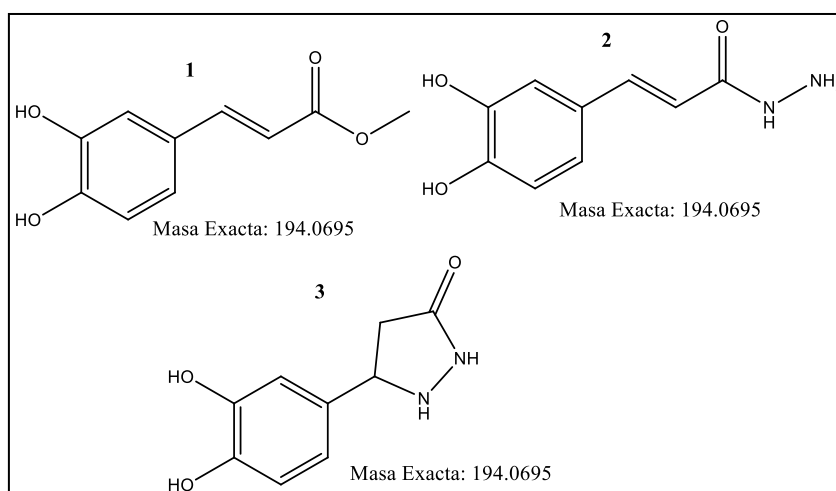


**Figura 57:** Señal de m/z 193,10 (arriba) del pico de tR 1,429 min (abajo) del cromatograma de la fracción DCM, proveniente de la modificación química de cafeato de metilo con hidracina, obtenido por CLAE-EM, fase reversa, modo de ionización negativo.



**Figura 58:** Señal de  $m/z$  193,100 (arriba) del pico de  $t_R$  1,33 min (abajo) del cromatograma de la fracción DCM, proveniente de la modificación química de cafeato de metilo con hidracina, obtenido por CLAE-EM, fase reversa, modo de ionización negativo.

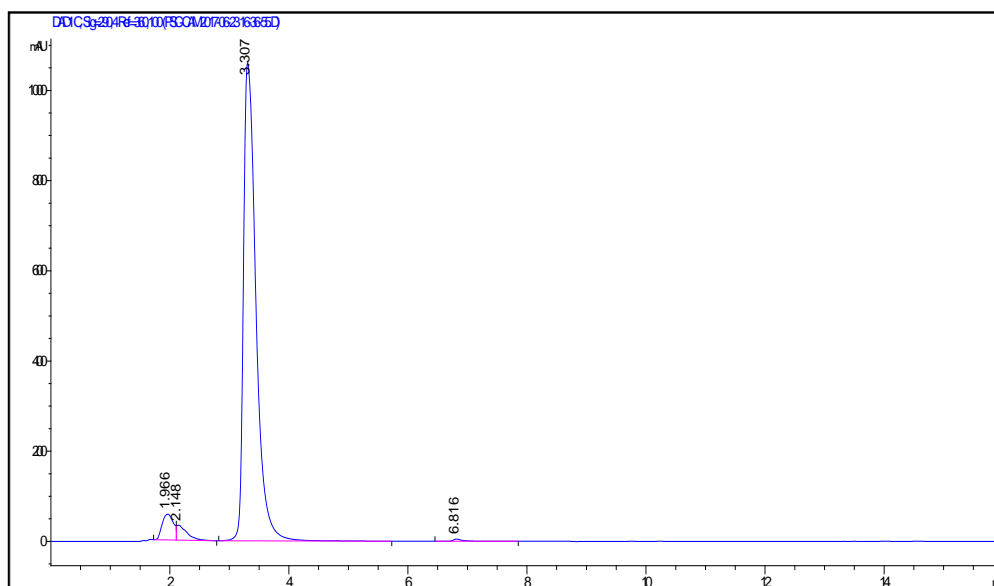
Dichas masas corresponden a iones moleculares  $[M+H]^+$  o  $[M-H]^-$  para  $M$  de fórmula posible  $C_{10}H_{10}O_4$  y/o  $C_9H_{10}N_2O_3$ , siendo las mismas coincidentes con las fórmulas moleculares de los compuestos **1** y **2 – 3** respectivamente (**Figura 59**).



**Figura 59:** Estructuras químicas posibles, que concuerdan con las  $m/z$  encontradas en los análisis de CLAE-EM.

Dado que el compuesto **1** corresponde al reactivo de partida de la reacción de modificación, se realizó un experimento de CLAE-UV para el

mismo (**Figura 60**), en idénticas condiciones a las aplicadas previamente para la fracción DCM (ver **Figura 52**).



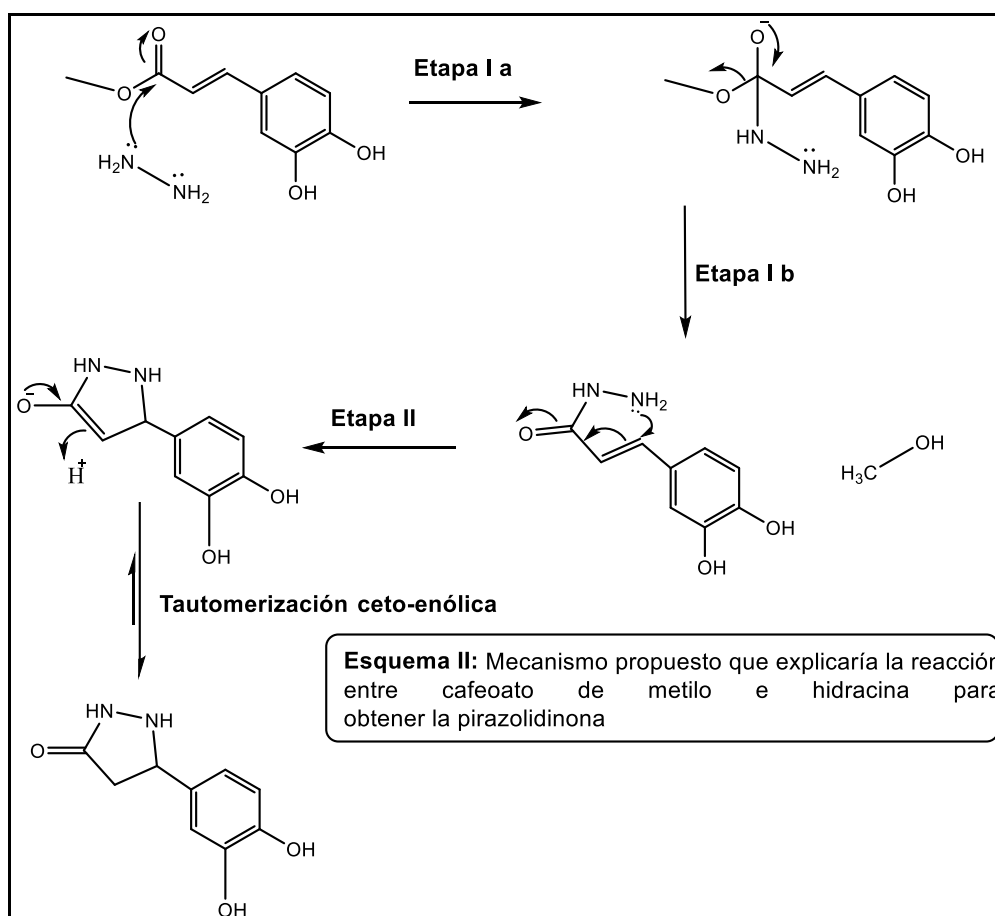
**Figura 60:** Perfil cromatográfico obtenidos por CLAE-UV a 290 nm de cafeato de metilo.

El resultado obtenido permite confirmar que el pico mayoritario observado en los experimentos de CLAE corresponde a cafeato de metilo.

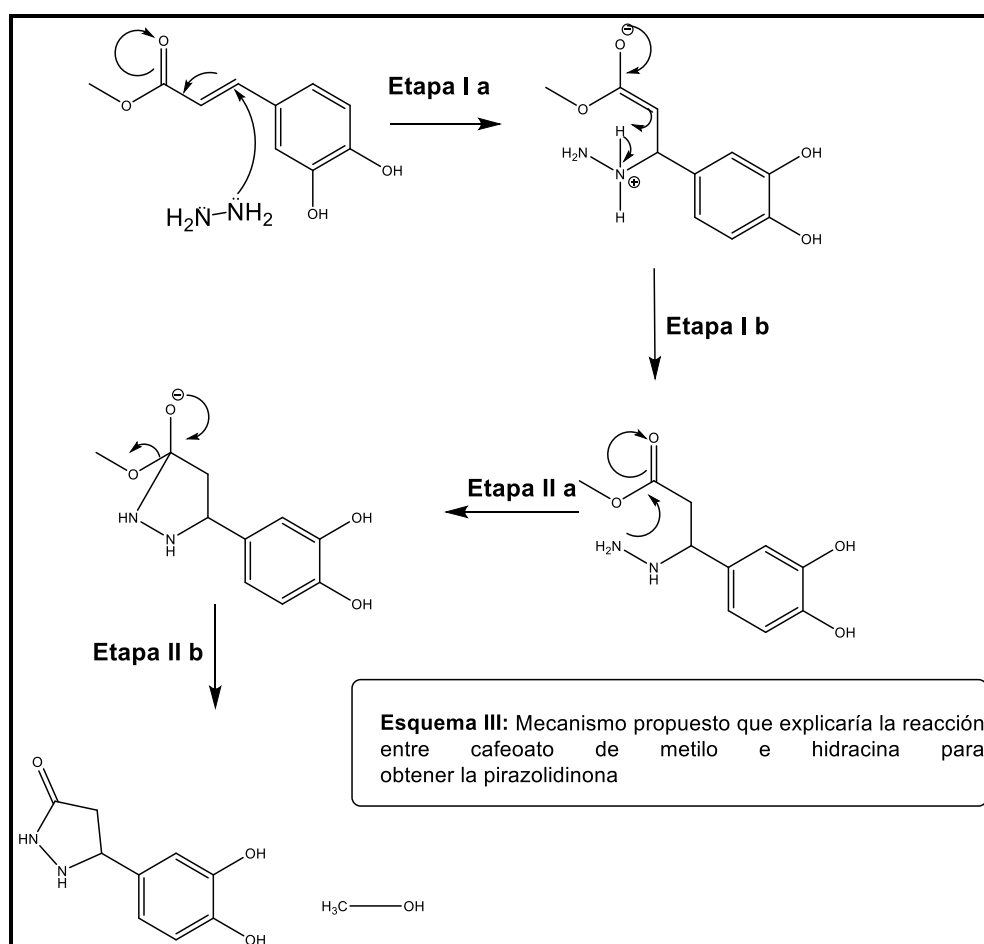
Por otro lado, el pico de tR 1,33 min visto por CLAE-EM en modo positivo decae fuertemente en modo de ionización negativo, sugiriendo la presencia de un compuesto capaz de ionizarse muy bien en modo positivo como ocurre en compuestos que contienen N básicos en su estructura. Resulta lógico pensar entonces que dicho pico podría provenir de un compuesto que ha incorporado N, el cual a su vez presenta actividad. Se infiere que este compuesto podría ser la hidrazida **2** que tiene NH libre a diferencia de la pirazolidinona **3**, ambas mostradas en la **Figura 59**. El pico de tR 1,42 min (**Figuras 52 y 55**) muestra la misma m/z que el de tR 1,33 min. Teniendo en cuenta que **2** es más polar que **3**, es el primero que saldría de la columna con el menor tiempo de retención y por lo tanto **3** podría ser el compuesto que origine el pico de tR 1,42 min. La pirazolidinona **3** es similar a la presentada previamente en el Esquema 1.

Previamente en esta Tesis se propuso que el ataque de la hidracina ocurría sobre el carbono carbonílico del éster del ácido clorogénico

(**Esquema 1, Etapa I a**), a partir de una adición-eliminación sobre dicho carbonilo, liberando el alcóxido correspondiente (**Esquema 1, Etapa I b**), a partir de una hidracinólisis donde el nucleófilo es la hidracina. En el cafeato de metilo podría ocurrir lo mismo (**Esquema 2, Etapas I a-b**), y la formación de la respectiva acil hidrazida **2** justificaría su presencia en el cromatograma visto anteriormente. Al quedar aún disponible un átomo de nitrógeno que es nucleófilo también, el mismo podrá atacar el doble enlace  $\alpha,\beta$ -insaturado vecino (**Esquema 2, Etapa II**), produciéndose un reordenamiento y generándose el ciclo que contiene a los dos átomos de nitrógeno. Como fue mencionado previamente, hay evidencias en nuestro grupo de este tipo de reordenamientos cuando la hidracina reacciona con flavonas. Estos posibles mecanismos darían como resultado un compuesto del tipo pirazolidinona **3**, derivada del éster del ácido cafeico, justificando su presencia entre los productos de reacción antes descriptos.



Otro posible mecanismo para la formación de pirazolidinonas se propone en el **Esquema 3** basado en información encontrada en la literatura.<sup>99</sup> En este esquema, se postula una primera etapa en la cual la hidracina se adiciona sobre el doble enlace a partir de un tipo de reacción denominado **Adición 1,3** (**Esquema 3, Etapa I a y I b**). En una segunda etapa, el segundo átomo de nitrógeno de la molécula de hidracina es también nucleofílico, por lo que puede atacar al grupo carbonilo. Entonces, se propone un posible segundo mecanismo de ataque de la hidracina que ocurriría sobre el carbono carbonílico del éster metílico del ácido cafeico (**Esquema 3, Etapa II a**), a partir de una adición-eliminación sobre dicho carbonilo y liberando el alcóxido como metanol (**Esquema 3, Etapa II b**). Esta última correspondería a una reacción de hidracinólisis ya que el nucleófilo es una hidracina.



La pirazolidinona **3** (**Figura 59**) podría formarse entonces siguiendo estos posibles mecanismos durante la reacción de modificación con



hidracina. Sin embargo, el intermediario de la adición 1,3 no fue detectado por CLAE-EM en las condiciones experimentales desarrolladas por lo cual se infiere que la reacción cursó principalmente por el primer mecanismo propuesto, es decir partiendo de la hidracinólisis del éster.

Finalmente, para intentar mejorar el rendimiento de esta reacción, se podría aumentar el tiempo de reacción y seguirla bajo condiciones suaves, ya que la cantidad de equivalentes de hidracina monohidrato influye fuertemente en la producción de los compuestos activos frente a tirosinasa.

#### 3.2.4. Escalado de la modificación química de cafeato de metilo y purificación de los activos mediante HPLC preparativo

Se modificaron 197 mg de cafeato de metilo con  $N_2H_4.H_2O$ , en las mismas condiciones previamente utilizadas, obteniéndose 120 mg de producto modificado en una única fracción MeOH. Posteriormente, se realizó el ensayo de tirosinasa para corroborar la presencia de los activos sembrando 30  $\mu g$  y eluyendo con fase móvil DCM:MeOH en proporciones 80:20. En este ensayo se observó actividad en zonas de la CCD similares a las mostradas anteriormente (**Figura 61**).



**Figura 61:** Ensayo de tirosinasa sobre CCD. Fase normal (sílica gel F<sub>254</sub>). Fase móvil: DCM:MeOH (80:20). Se sembró la muestra correspondiente al cafeato de metilo modificado (CAMM)

Habiendo dado positivo el ensayo de tirosinasa, se procedió a analizar la muestra por CLAE-UV analítico en fase reversa, para luego extrapolar las condiciones de separación a CLAE preparativo.

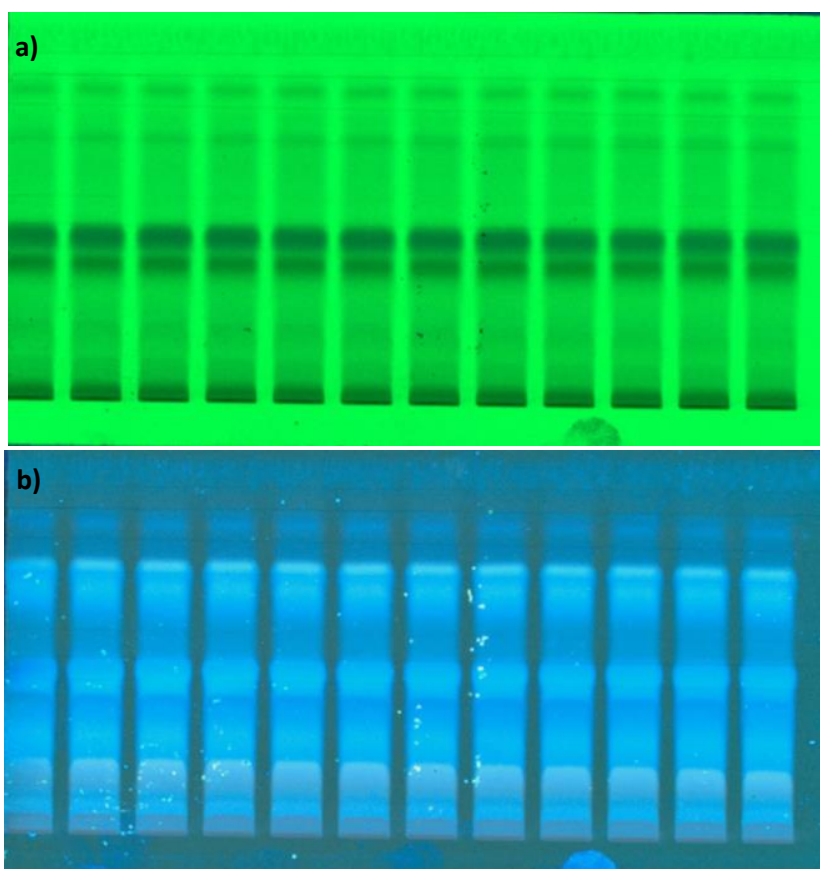
Luego de realizar el experimento, se recuperaba la actividad pero las subfracciones resultaban impuras.

### 3.2.5. Purificación de activos por HPTLC e interfaz de EM

Utilizando un equipo CAMAG TLC (**Figura 62**), se sembraron 13 calles, en cada una de ellas 100µg de cafeato de metilo modificado. Luego con el mismo equipamiento, se desarrolló la CCD utilizando fase móvil (DCM:MeOH) en proporciones (80:20), revelando bajo luz UV a 254 y 365nm (**Figura 63**).



**Figura 62:** Equipo CAMAG para experimentos con HPTLC



**Figura 63:** Revelado bajo luz uv 254nm (a) y con luz uv 365nm (b) sobre CCD. Fase normal: sílica gel F254. Fase móvil DCM:MeOH (80:20). Siembra: 100µg del producto de cafeato de metilo modificado con hidracina monohidrato.

Una vez desarrollada la placa, se recortó una de las calles para efectuar el ensayo de tirosinasa y así realizar el seguimiento bioguiado (**Figura 64**).



**Figura 64:** Ensayo de tirosinasa sobre CCD. Fase normal (sílica gel F<sub>254</sub>). Fase móvil: DCM:MeOH (80:20). Se sembraron 100µg de cafeato de metilo modificado con hidracina monohidrato. Se señalan en la imagen con recuadro azul las zonas de la placa que resultaron activas.

Una vez que se detectaron en la placa las zonas de actividad, se procedió a utilizar el interfaz-MS como complemento del equipo CAMAG, para desadsorber los compuestos activos de las zonas señaladas (**Figura 65**).



**Figura 65:** Imagen correspondiente al interfaz-MS, complemento del CAMAG.

Se obtuvieron 4 sufracciones (S1, S2, S3 y S4) correspondientes a las 4 zonas desadsorbidas de la placa utilizando MeOH como solvente, a las que luego se le hicieron el ensayo de tirosinasa (**Figura 66**).

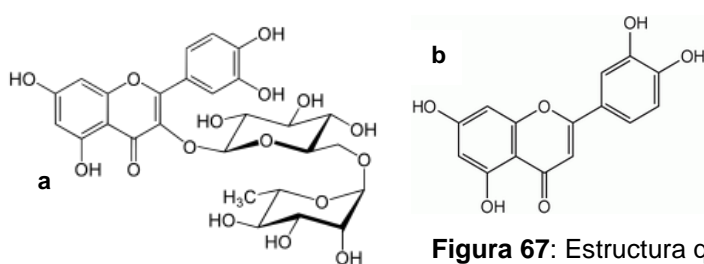


**Figura 66:** Ensayo de tirosinasa sobre CCD. Fase normal (sílica gel F<sub>254</sub>). Fase móvil: DCM:MeOH (80:20). Se sembraron la muestra correspondiente al cafeoato de metilo modificado (CAMM) y las 4 subfracciones en orden de polaridad creciente (S1, S2, S3 y S4 respectivamente).

Como se puede observar en la **Figura 66**, no se recuperó la actividad luego de realizar el experimento. Ello puede deberse a un efecto de dilución debido a la baja cantidad de muestra recuperada para las subfracciones. Adicionalmente, no se pudieron hacer experimentos para elucidación estructural. Por otra parte, se hicieron experimentos de actividad en microplaca del cafeoato de metilo modificado con N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> y del compuesto de referencia, el ácido kójico. Los resultados indicaron que el cafeoato de metilo modificado tuvo un valor de Cl<sub>50</sub>: (220,4±1,3) μM y el ácido kójico de Cl<sub>50</sub>: (14,9±1) μM. No se llegó a purificar el compuesto sino, que se obtuvo una subfracción con al menos 3 compuestos. Por lo cual, el valor de actividad obtenido pudo haber sido sujeto a efectos de dilución.

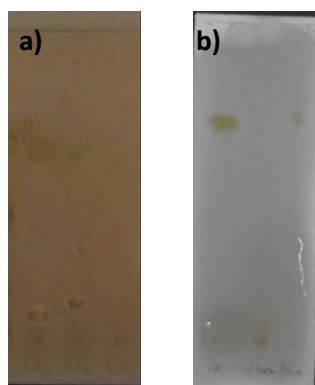
### 3.3 Estudio de otros componentes de *C. scolymus*

Otros componentes descritos en extractos de *C. scolymus*, susceptibles de ser modificados con hidracina monohidrato, son rutina y luteolina. Estos compuestos poseen grupos funcionales y regiones en sus estructuras aptas para reaccionar con hidracina monohidrato (**Figura 67**). En consecuencia, se planteó la modificación química de ambos compuestos en las condiciones de reacción aplicadas previamente en los extractos de *C. scolymus*.



**Figura 67:** Estructura química de a) Rutina y b) Luteolina

Luego de haber terminado con la modificación de estos compuestos, se hizo el ensayo de tirosinasa, sobre las fracciones obtenidas en cada *work up* (**Figura 68**).



**Figura 68:** Ensayo de tirosinasa sobre CCD, de fase normal sílica gel F<sub>254</sub> cuya fase móvil fue DCM:MeOH en proporciones 80:20. Se sembraron a) rutina, f DCM, f BuOH b) luteolina, f DCM, f BuOH, respectivamente.

Los resultados indican que, si bien rutina y luteolina se describen en extractos de *C. scolymus*, los productos de modificación de dichos compuestos con hidracina monohidrato no presentan actividad frente a la enzima tirosinasa en las condiciones ensayadas.









## **CAPÍTULO IV**

#### 4.1 Actividad de extractos modificados en bromodominios de *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo flagelado y el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Tiene un ciclo de vida complejo que alterna entre dos huéspedes y por lo menos tres estadios de desarrollo diferentes. Este parásito presenta características únicas que lo hacen un interesante modelo para el estudio de diversas problemáticas de las células eucariotas.<sup>110</sup>

El bromodominio es un dominio proteico de unión a lisinas acetiladas, descrito originariamente en proteínas de unión a histonas acetiladas. Este dominio evolutivamente conservado se encuentra comúnmente en proteínas nucleares que cumplen funciones relacionadas con la regulación de la estructura de la cromatina y la activación transcripcional. La capacidad única del bromodominio de reconocer lisinas acetiladas se relaciona con un nuevo mecanismo de regulación de las interacciones proteína-proteína vía acetilación de lisinas, el cual tiene amplias consecuencias en variados procesos celulares.<sup>111</sup>

En el genoma de *T. cruzi* están presentes seis secuencias codificantes para proteínas con bromodominios. Un miembro de nuestro grupo caracterizó una de ellas, denominada Factor con Bromodominio 3 (TcBDF3), y evaluó su expresión en el parásito, su localización subcelular, su capacidad de interaccionar con sustratos acetilados y su rol en la biología de los tripanosomas.<sup>112</sup> TcBDF3 se expresa en todos los estadios del ciclo de vida, presentando una localización atípica. En epimastigotes y amastigotes se encuentra en el citoplasma, flagelo y bolsillo flagelar mientras que en tripomastigotes solo en el flagelo. Se pudo determinar que este bromodominio es capaz de interaccionar con la  $\alpha$ -tubulina acetilada presente en el citoesqueleto y flagelo de *T. cruzi*. Además, esta unión parece ser específica ya que no es capaz de reconocer histonas acetiladas. La sobre-expresión de una versión truncada de TcBDF3 hace que se pierda la localización flagelar y disminuye la capacidad de los epimastigotes de diferenciarse a tripomastigotes, proceso denominado metaciclogénesis. Al sobre-expresar de manera inducible una versión salvaje y una doble

mutante puntual de TcBDF3 se observa nuevamente una disminución en la tasa de metaciclologénesis y efectos en las tasas de infección in vitro (esta doble mutante no posee la capacidad de unir  $\alpha$ -tubulina acetilada). Estos resultados sugieren que este bromodominio es esencial para *T. cruzi* y jugaría un papel importante en el proceso de diferenciación e infección.<sup>112</sup>

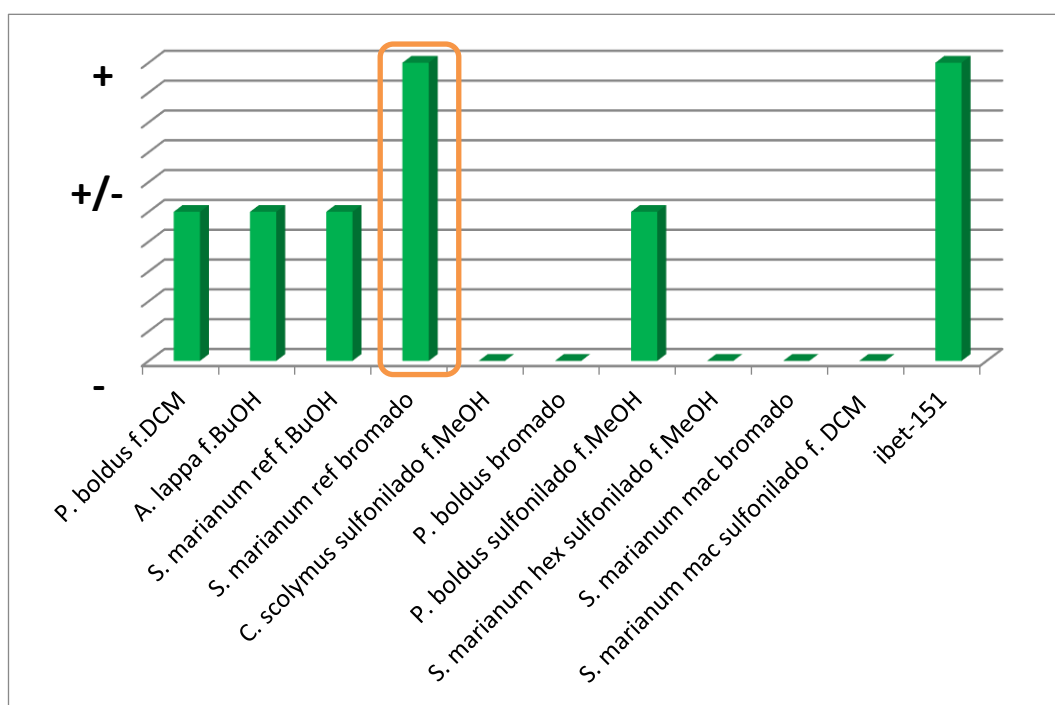
En los últimos cinco años se han desarrollado diversos inhibidores de bromodominios. Uno de ellos, desarrollado por GlaxoSmithKline, es el iBET-151 que fue cedido para evaluar su actividad en *T. cruzi*. Este compuesto es un derivado de quinolina isoxazoles y se ha demostrado que interacciona con el bromodominio N-terminal de la proteína BRD2 humana y es capaz de unirse al bolsillo de reconocimiento de la lisina acetilada.

Para determinar si el iBET-151 se une efectivamente a TcBDF3 se realizaron ensayos de desactivación o “quenching” de la fluorescencia. Se considera que las proteínas tienen fluorescencia intrínseca debido a la presencia de aminoácidos aromáticos: triptófano (W), tirosina (Y) y fenilalanina (P). La mayoría de las emisiones fluorescentes intrínsecas de una proteína plegada se deben a la excitación de los residuos de W, con algunas emisiones debido a la Y y P. El triptófano tiene una longitud de onda máxima absorción de 280 nm y un pico de emisión que va desde 300 a 350 nm dependiendo de la polaridad del medio ambiente. Entonces, la disminución en la emisión de fluorescencia de los triptófanos puede utilizarse para determinar el estado conformacional de una proteína, así como cambios en la polaridad del ambiente por la presencia de ligandos específicos. El hallazgo de inhibidores de este bromodominio resulta de gran interés en medicina, ya que tiene gran relevancia en la enfermedad de Chagas.<sup>110</sup>

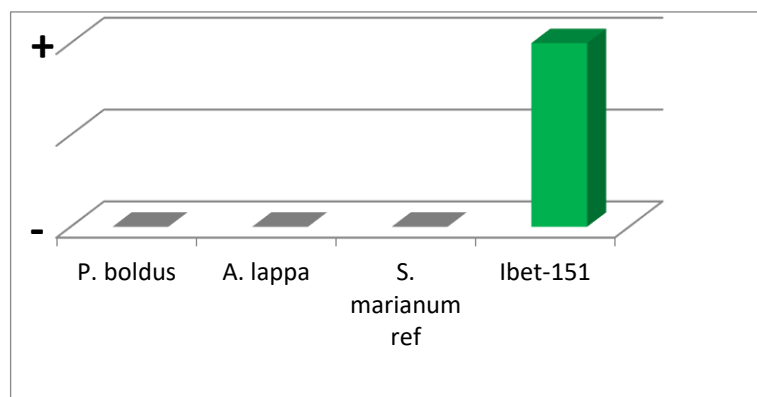
#### **4.2 Resultados obtenidos para extractos modificados por sulfonilación, bromación e hidracinólisis.**

Para comparar la respuesta de los extractos en cuanto a sus propiedades biomoleculares, se analizaron 10 extractos modificados con sus respectivos testigos, 3 extractos nativos, dando un total de 13 muestras analizadas. Las muestras fueron evaluadas en una solución de

concentración 0.2 mg/mL en DMSO. De la totalidad de extractos ensayados, resultó positivo el extracto de *Silybum marianum* reflujo modificado con bromo (**Figura 69**, recuadrado en anaranjado). En realidad, varias muestras resultaron positivas, sólo que esta última arrojó un resultado al mismo nivel que el inhibidor de referencia (iBET-151). Además, se ensayaron los tres extractos nativos, con el fin de probar si la actividad se producía luego de las modificaciones químicas correspondientes (**Figura 70**).



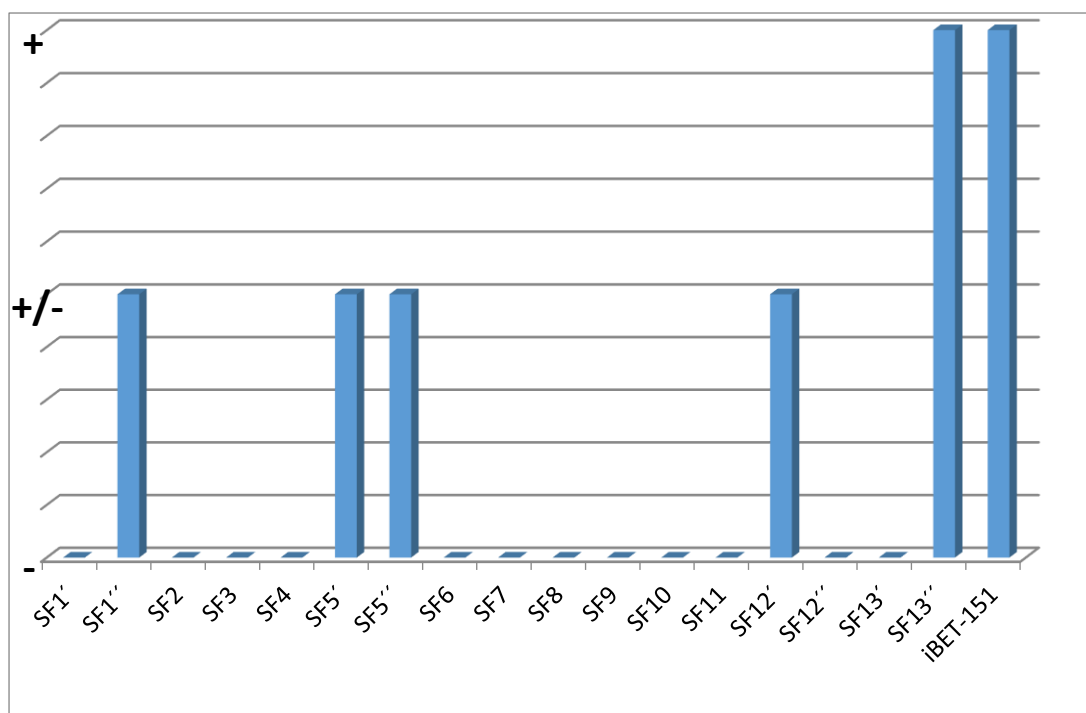
**Figura 69:** Resultados de las muestras evaluadas para detectar inhibidores de bromodominio funcional 3 de *T. cruzi*, de extractos modificados



**Figura 70:** Resultados de las muestras evaluadas para detectar inhibidores de bromodominio funcional 3 de *T. cruzi*, de extractos nativos.

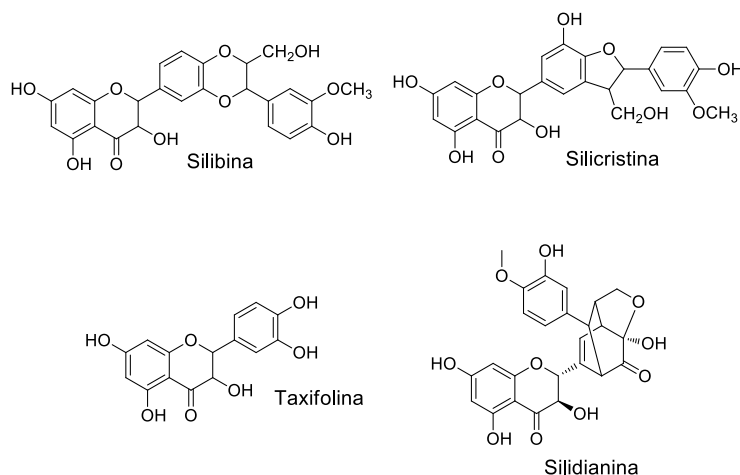
Como se observa en la Figura 70, los extractos nativos ensayados no resultaron activos, por lo que se supone que la actividad hallada en los modificados es inherente a la reacción química aplicada.

El extracto de *Silybum marianum* reflujo bromado, cuya actividad resultó interesante, se fraccionó por CC utilizando mezclas de Hexano-AcOEt de polaridades crecientes. Se obtuvieron 17 subfracciones (SF1' SF1'' SF2 SF3 SF4 SF5' SF5'' SF6 SF7 SF8 SF9 SF10 SF11 SF12' SF12'' SF13' SF13'') y se analizaron cromatográficamente cada una de ellas, así como también biológicamente. El análisis de actividad biológica determinó que la subfracción responsable de la actividad sobre bromodominio es la SF13'' (**Figura 71**).



**Figura 71:** Resultados de las muestras, correspondientes a las diferentes subfracciones provenientes de la cromatografía en columna realizada sobre el extracto de *S. marianum* reflujo modificado con bromo, evaluadas para detectar inhibidores de bromodominio funcional 3 de *T. cruzi*

La masa obtenida de la subfracción activa en bromodominios resultó muy baja. Dado que el extracto de *Silybum marianum* debería contener silimarinas (silibina, silidianina y silicristina) y taxifolina,<sup>113</sup> y que todos estos metabolitos presentan anillos aromáticos y dobles enlaces alifáticos potencialmente reactivos frente a bromo (**Figura 72**), se modificaron químicamente el grupo de las silimarinas y taxifolina con bromo a fin de evaluar si sus productos modificados eran activos en el ensayo de bromodominio descripto.

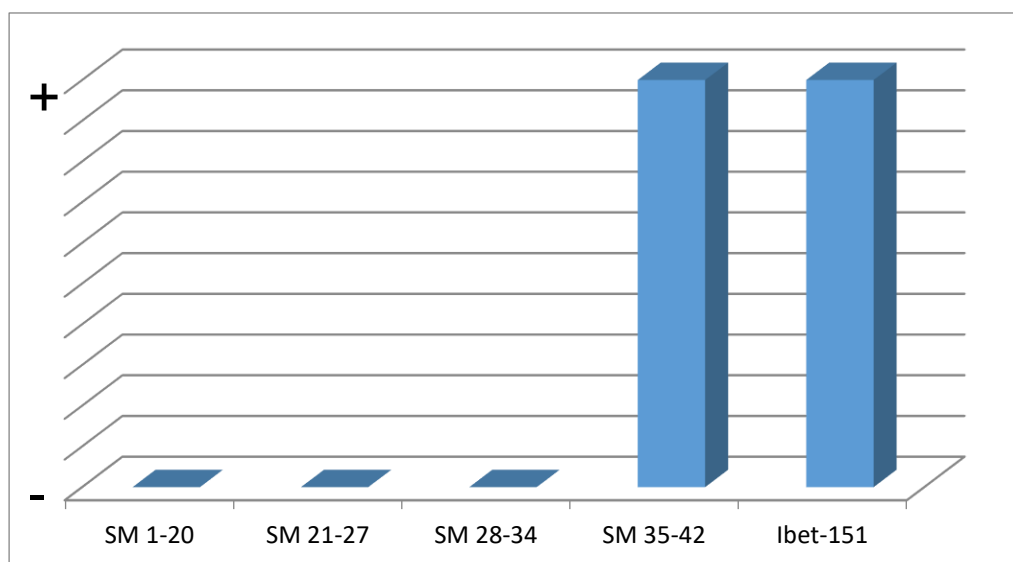


**Figura 72:** Estructuras químicas de los principales constituyentes químicos del extracto de *Silybum marianum*: silimarinas (silicristina, silibina y silidianina) y taxifolina.

#### 4.2.1. Modificación química de Silimarinas y Taxifolina con bromo

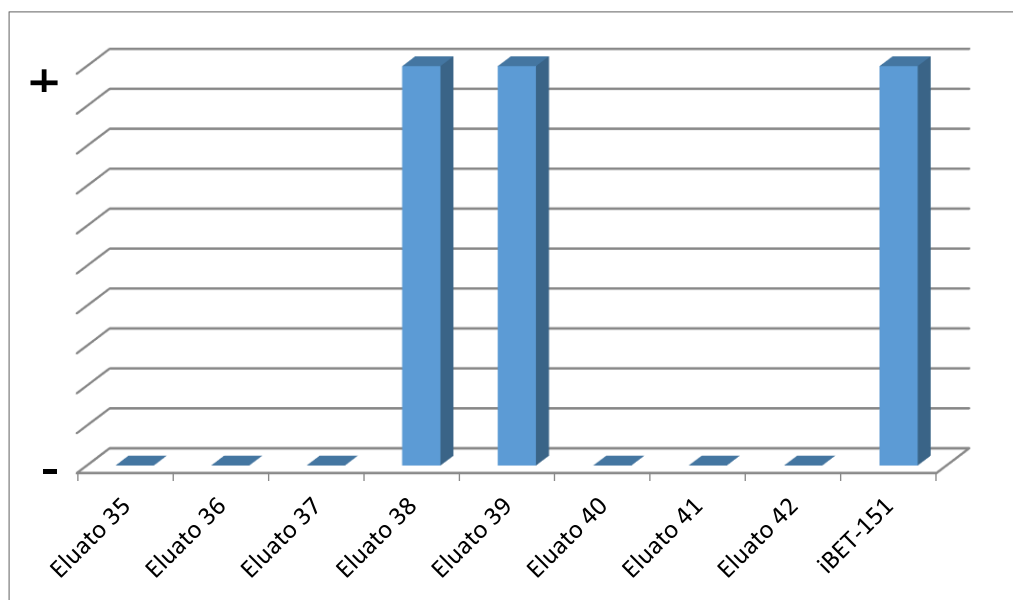
Se modificaron químicamente con bromo 321.3 mg de silimarinas, con el fin de observar si estos compuestos bromados son los responsables de generar inhibición del bromodominio en estudio. Al realizar el ensayo de actividad de la mezcla modificada, la misma dio positiva.

Posteriormente se procedió a la obtención de subfracciones de la mezcla de silimarinas modificadas. Para ello se realizó una cromatografía en columna, utilizando mezclas de Hexano-AcOEt de polaridades crecientes, obteniéndose un total de 42 eluatos. Luego se tomaron 100  $\mu$ L de los mismos y se reunieron de la siguiente manera: 1-20, 21-27, 28-34 y 35-42. Estas cuatro muestras resultantes se enviaron para ensayo de bromodominios resultando positiva la fracción 35-42 (**Figura 73**).



**Figura 73:** Resultados de las muestras, correspondientes a las diferentes subfracciones provenientes de la cromatografía en columna realizada sobre Silimarinas modificadas con bromo, evaluadas para detectar inhibidores de bromodominio funcional 3 de *T. cruzi*

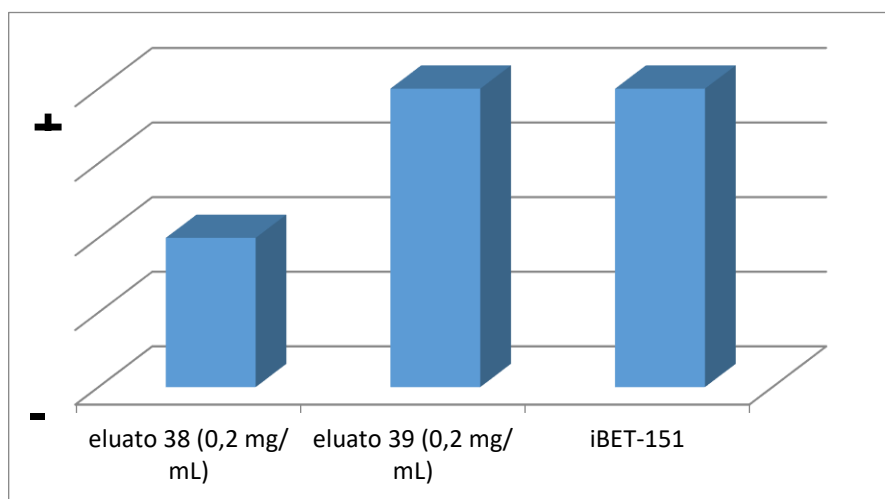
Por lo tanto, se ensayaron 100  $\mu$ L de cada uno de los eluatos comprendidos entre los tubos 35 y 42, inclusive. Los eluatos que resultaron activos fueron 38 y 39, con bioactividad al nivel del iBET-151 (**Figura 74**).



**Figura 74:** Resultados de las muestras, correspondientes a los diferentes eluatos de la subfracción SM 35-42 provenientes de la cromatografía en columna realizada sobre Silimarinas modificadas con bromo, evaluadas para detectar inhibidores de bromodominio funcional 3 de *T. cruzi*.



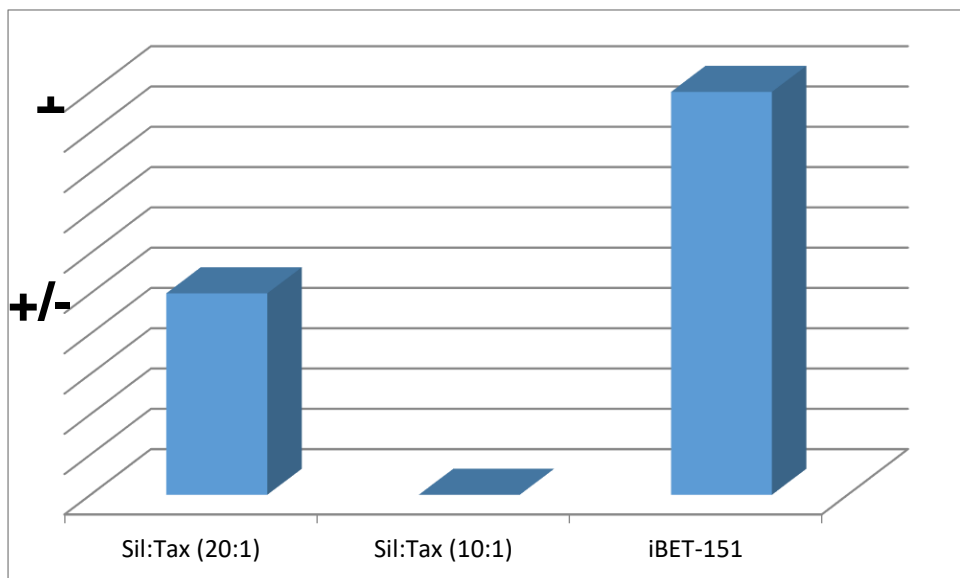
De esta manera se prepararon soluciones de 0.2 mg/mL de los eluatos 38 y 39, las cuales se volvieron a enviar para ser ensayadas. Nuevamente se obtuvieron resultados positivos: el eluato 38 resultó activo con una intensidad menor que el iBET-151 y el 39 al mismo nivel (**Figura 75**).



**Figura 75:** Resultados de las muestras, correspondientes a los eluatos 38 y 39 de la subfracción SM 35-42 provenientes de la cromatografía en columna realizada sobre Silimarinas modificadas con bromo, evaluados a una concentración de 0.2 mg/mL, para detectar inhibidores de bromodominio funcional 3 de *T. cruzi*.

Por otro lado, se modificaron 70.3 mg de taxifolina con bromo, con el mismo fin que se hizo para el grupo de las silimarinas. El resultado para el ensayo de bromodominios dio negativo, tanto para la taxifolina pura como para la modificada.

Se buscó en bibliografía en qué proporciones se hallaban el grupo de las silimarinas y taxifolina<sup>114</sup>, para corroborar si podría haber una especie de sinergismo, aditividad, en relación a la actividad hallada. La relaciones de éstas dentro del extracto resultó la siguiente: (silimarinas:taxifolina) (20:1). De esta manera, se prepararon soluciones de 0.2 mg/mL de esta relación y de otra a (10:1) correspondientes a silimarinas y taxifolina bromadas, para realizar el ensayo de inhibición de bromodominios. Como se puede ver en la **Figura 76**, el resultado es positivo para la relación 20:1 y negativo para la 10:1.



**Figura 76:** Resultados de las muestras, correspondientes a soluciones de Silimarinas:Taxifolina bromadas, en proporciones 20:1 y 10:1, evaluados a una concentración de 0.2 mg/mL, para detectar inhibidores de bromodominio funcional 3 de *T. cruzi*.

El resultado positivo que se observa en la Figura 75, correspondiente a la proporción de silimarina:taxifolina (20:1), indica que el responsable de la actividad es el grupo de las silimarinas bromadas. Este resultado puede corroborarse, en tanto que cuando se disminuye la proporción en relación a las silimarinas bromadas (10:1), el resultado fue negativo. Por lo cual no hay un efecto de sinergismo ni aditividad en relación a la actividad hallada.



## **4. CONCLUSIONES**

En este trabajo de tesis se seleccionaron de entre 52 muestras de especies vegetales de uso en medicina popular, 3 muestras de especies crecidas por cultivo en el campo experimental Parque Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNR: *Cynara cardunculus* var. *scolymus* cultivar Oro Verde, cultivar Gauchito y cultivar Gurí, sumado a 3 muestras de especies que crecen espontáneamente en la zona centro de nuestro país, *Peumus boldus*, *Arctium lappa* y *Sylibum marianum*.

Se prepararon 7 extractos nativos provenientes de plantas medicinales utilizando como métodos de extracción maceración, calentamiento a reflujo y soxhlet. Estas técnicas se aplicaron en serie partiendo de cada droga vegetal utilizando metanol como solvente para maceración y calentamiento a reflujo, y hexano para soxhlet. La composición química de los extractos fue analizada utilizando técnicas cromatográficas como cromatografía en placa delgada (CCD) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL-EM). Para el caso de la especie *C. scolymus* se encontraron diferencias significativas de composición observadas tanto por el análisis en CL-EM como por CCD. Por otro lado, los extractos naturales obtenidos por maceración en *C. scolymus* mostraron contener ácido clorogénico y cinarina. Estos compuestos son ésteres fenólicos derivados de los ácidos cafeico y quínico y su contenido en la planta depende entre otros factores del genotipo. Utilizando experimentos de CL-UV a 280 y 330 nm acoplados a EM de alta resolución se estudió el perfil químico de los extractos naturales de *C. scolymus* de las cultivares Oro Verde FCA, Gauchito FCA y Gurí FCA con el fin de seleccionar la cultivar con mayor proporción de anillos aromáticos y ésteres cafeilquínicos. Los cromatogramas obtenidos por CL-UV para los extractos de las tres cultivares y los espectros de EM/EM del ácido clorogénico y cinarina detectados en ellos, permitieron la cuantificación de estos componentes en las tres cultivares utilizando los ácidos clorogénico y 1,3-dicafeilquínico como patrones de referencia. Los resultados obtenidos permiten concluir que Gauchito es la cultivar con mayor proporción de

ésteres cafeilquínicos y en consecuencia sus extractos fueron los seleccionados para modificación química.

Los extractos de las demás especies en estudio fueron analizados cualitativamente por CCD. Los perfiles cromatográficos de los extractos de *S. marianum* mostraron composiciones diferentes comparando los extractos obtenidos por maceración y por reflujo, por lo cual todos los extractos provenientes de estas dos especies fueron seleccionados para modificación química. En cambio, los extractos de *A. lappa* y *P. boldus* obtenidos por maceración y calentamiento a reflujo mostraron perfiles cromatográficos muy similares, por lo cual sólo los extractos obtenidos por maceración fueron seleccionados para su posterior modificación química ya que el rendimiento de la extracción fue mayor en este caso que el obtenido mediante calentamiento a reflujo. Además, se obtuvieron 42 extractos modificados a partir de los 7 nativos luego de aplicar sobre éstos reacciones de sulfonilación, bromación e hidracinólisis. El impacto de las reacciones de modificación se corroboró utilizando técnicas cromatográficas de CCD (con reveladores) y CL-EM, observándose cómo se modifica el perfil de los extractos nativos luego de las reacciones químicas aplicadas. La modificación de grupos C=O presentes en más del 70% de los productos naturales ofrece el acceso óptimo para la incorporación de N a través del empleo de hidracinas, por lo cual y como se demostró previamente, la hidracina monohidrato es un reactivo interesante para lograr modificar químicamente una buena parte de los PNs presentes en los extractos naturales y así diversificarlos químicamente. La reacción de sulfonilación permitiría incorporar el grupo sulfonilo a las moléculas capaces de reaccionar con cloruro de *p*-toluen sulfonilo. El grupo sulfonilo presenta propiedades de reconocimiento interesantes y de acuerdo al grupo alquilo unido al azufre esta reacción sirve como puerta de entrada a la introducción de otros grupos de reconocimiento potencialmente interesantes para generar actividad biológica. La incorporación de halógenos, como el bromo en este caso, es una estrategia común en el diseño de drogas que tiene por objetivo cambiar las bioactividades y especificidades de moléculas hacia determinados blancos terapéuticos.

El efecto de la modificación química de los extractos sobre sus propiedades químicas fue evaluado por medio de la actividad antioxidante. La comparación de los perfiles cromatográficos de los extractos naturales y modificados con hidracina indica la existencia de cambios significativos de composición. Los extractos modificados presentan nuevas bandas captadoras de radicales libres, demostrando que nuevos compuestos emergen con esta actividad. La reacción con hidracina resulta interesante como estrategia para alterar la composición química de los extractos estudiados e incrementar la diversidad de moléculas con propiedades captadoras de radicales libres.

Por otro lado, el efecto de la modificación química de los extractos sobre sus propiedades biomoleculares fue evaluado por medio de cuatro ensayos bioautográficos que permiten detectar inhibidores de las enzimas  $\beta$ -glucosidasa, acetilcolinesterasa, xantina oxidasa y tirosinasa. La falta de actividad inhibitoria de todas las mezclas (naturales y semisintéticas) frente a las tres primeras enzimas sugiere que en este grupo de extractos, las reacciones aplicadas no tienen efectos detectables por bioautografía sobre estas actividades biomoleculares. Sin embargo, los resultados con tirosinasa muestran cambios en la actividad biológica para los extractos de *C. scolymus* que, en principio, estarían relacionados con una reacción de modificación ya que los mismos se evidencian en sus extractos modificados con hidracina y no así en los demás extractos modificados ni nativos.

Asimismo, como se citó previamente, la comparación de perfiles de CL-EM de los extractos controles y modificados con hidracina de *C. scolymus*, indica la existencia de cambios significativos en la composición, resultantes de la reacción. Uno de los cambios más interesantes, como se vio en la **Figura 38** es la desaparición del pico correspondiente al ácido clorogénico, lo cual sería bastante lógico por su característica estructural apta para reaccionar con hidracina.

En relación a la actividad tirosinasa hallada, sobre los extractos de *C. scolymus* macerado y reflujo modificados con hidracina monohidrato fracción BuOH, se sospecha que proviene de la modificación química del

ácido clorogénico con hidracina, entre otros posibles compuestos. Este metabolito se encuentra reportado en la droga vegetal de la especie. Finalmente, la actividad inhibitoria frente a la enzima tirosinasa ocurre solamente en los extractos modificados, por lo que se infiere que los compuestos que generan dicha actividad son productos de la modificación química con hidracina. Avalado por la información proveniente de los espectros de RMN y EM, sospechamos que uno de los activos es una pirazolidinona, la cual es producto de reacción entre el ácido clorogénico e hidracina.

La modificación química de ácido clorogénico con hidracina monohidrato bajo distintas condiciones muestra que la cantidad de hidracina utilizada en la reacción es relevante a la hora conservar la actividad tirosinasa de los productos modificados (relación óptima ác. clorogénico:N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1:1,5). La porción cafeoil del ácido clorogénico reacciona con hidracina, ya que al modificar el cafeoato de metilo con esta última se produce el mismo perfil de actividad tirosinasa que el encontrado para los productos del clorogénico modificado. Teniendo en cuenta los experimentos de CLAE-EM, se detectaron masas que concuerdan con la generación de una cafeoilpirazolidinona y cafeoil hidrazida a partir de la modificación química de cafeoato de metilo con hidracina.

En cuanto a los otros componentes de *C. scolymus*, rutina y luteolina, tras la modificación química con hidracina monohidrato, no se producen compuestos activos frente a la enzima tirosinasa.

Además, se halló la presencia de un compuesto ubicuo, el cual se genera a partir de la reacción entre AcOEt e hidracina, durante el work up. Por este motivo se modificó el protocolo de la reacción de hidracinólisis, obviando el lavado con AcOEt. En relación a este compuesto ubicuo se corroboró y caracterizó inequívocamente como diacetil hidrazida (DAH) haciendo experimentos de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, EM y espectroscopía IR. DAH resultó activa frente a la enzima tirosinasa. Su CI<sub>50</sub> resultó 1.56 veces mejor que la del inhibidor de referencia (ácido kójico) y no es citotóxica a 200 µM frente células VERO.



Con el objeto de analizar el efecto de la modificación química de los extractos sobre otras propiedades biomoleculares, se aplicó un nuevo ensayo que permite detectar inhibidores del bromodominio TcBDF3. En cuanto a este ensayo biológico se halló actividad sobre el extracto de *Silybum marianum* bromado. Una de las subracciones obtenidas, luego de realizar la CC, recupera la actividad del extracto total. Se trabajó luego, con los componentes mayoritarios reportados para dicho extracto, que son el grupo de las Silimarinas y Taxifolina. Ambos se modificaron con bromo, resultando activa una fracción de purificación proveniente del grupo de las silimarinas bromadas, con una actividad del orden del inhibidor de bromodominios reportado (iBET-151). El ensayo de inhibición con proporciones en que el grupo de las silimarinas y taxifolina se hallan en el extracto (20:1, respectivamente), utilizando silimarina y taxifolina modificadas con bromo, la relación (20:1) dio positiva pero en menor intensidad que iBET-151. Esto nos sugiere que el responsable de dicha actividad, es el grupo de las silimarinas bromadas.







## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 5.1 Equipamientos y reactivos

Las columnas cromatográficas en fase normal se realizaron con Sílica Gel 230-400 mesh 60H (Merck). Las imágenes de las CCD y las autografías fueron digitalizadas en un equipo Chromadoc-IT con lámparas de UV de 254 nm y 365 nm adicionado con cámara digital Olympus de 5.1 megapíxeles.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , fueron registrados utilizando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno en un espectrómetro marca Bruker modelo Avance II de 600 MHz (Bruker, Karlsruhe, Germany). Las muestras fueron disueltas en  $\text{CDCl}_3$  y MeOD. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se informaron en ppm en relación al pico de TMS (0 ppm).

Los análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masa (CLAE-EM), se realizaron en un cromatógrafo líquido Agilent Technologies modelo 1200 RR con la siguiente configuración: desgasificador online modelo G1379B, bomba binaria SL modelo G1312B, inyector-autosampler SL modelo G1367D, termostato y horno de columnas SL modelos G1330B y G1316B, detector VW SL G1314C. Columna: RF Symmetry® C18 de 150 mm de longitud x 3,9 mm de diámetro interno, con tamaño de partícula de 5 mm. El espectrómetro de masa acoplado al cromatógrafo líquido de alta eficiencia, corresponde a un equipo microTOF-Q II de Bruker Daltonics. Las CCD y las autografías fueron desarrolladas con cromatofolios de Sílica gel 60 F254 (sobre aluminio, Merck).

Las imágenes de las CCD y las autografías fueron digitalizadas en un equipo Chromadoc-IT con lámparas de luz visible, UV de 254 nm y 365 nm adicionado con cámara digital Olympus de 5.1 megapíxeles. Los análisis de imágenes se llevaron a cabo utilizando el programa Gel-Pro Analyzer v4.00 (Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD, USA).

Los solventes utilizados fueron previamente rectificados en nuestro laboratorio exceptuando a los solventes de calidad CLAE-EM.

Los reactivos cloruro de *p*-toluen sulfonilo, hidracina monohidrato, esculina hidrato, resina tris-aminoethyl polymer bound, L-tirosina, azul de nitrotetrazolio (NBT) y DPPH fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los reactivos tiosulfato de sodio, acetato de sodio, cloruro férrico hexahidratado, ácido acético glacial, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio y ácido etilendiaminotetracético fueron adquiridos de Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). El agar fue adquirido de Britania (Buenos Aires, Argentina). Los reactivos ácido *tris* hidrocloreídrico y 1- naftil acetato fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). La sal fast blue B y la xantina fueron adquiridos de Fluka (Buchs, Switzerland).

Las enzimas  $\beta$ -Glucosidasa (de almendras), acetilcolinesterasa (de anguila), xantina oxidasa (microbiana) y tirosinasa (de hongos) fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Las reacciones enzimáticas realizadas durante los ensayos de inhibición enzimática en microplaca de 96 pocillos se monitorearon utilizando un lector de microplacas POLARstar Omega (BMG LABTECH, Offenburg, Alemania)

## 5.2 Material vegetal utilizado

Las especies de *Peumus boldus*, *Arctium lappa* y *Silybum marianum*, fueron recolectadas por el Farmacéutico Jaime Dubner. La especie de *Cynara scolymus* nos fue facilitada por Rosana Rotondo y Stella Maris García investigadoras de la Facultad de Ciencias Agrarias, campo Villarino, Universidad Nacional de Rosario.

## 5.3 Preparación de los extractos nativos

La metodología para preparar los extractos consistió en maceración seguida de extracción a reflujo. Inicialmente se realizaron dos maceraciones partiendo de 512,45 g de hojas de *Peumus boldus*, de 500,08 g de tallos y raíces de *Arctium lappa*, de 485,30 g de semillas de *Silybum marianum* y 261,21 g de hojas de *Cynara scolymus* utilizando una relación de gramos de material vegetal/mililitros de solvente equivalente a 10g/100mL siendo el tiempo de cada maceración 30 minutos. Finalizada la extracción por maceración se procedió a filtración y el residuo resultante se



sometió a calentamiento a reflujo con 100 mL de metanol durante 30 minutos. Este procedimiento de extracción por reflujo se repitió 3 veces. Sólo para el caso de las semillas de cardo mariano, previo a la maceración y reflujo, se realizó una extracción por Soxhlet utilizando 50 mL de hexano como solvente a fin de extraer los lípidos.

#### 5.4 Generación de extractos modificados

##### 5.4.1 Reacción de bromación

Se utilizó un protocolo para la modificación de extractos por bromación teniendo en cuenta directamente bromo líquido como reactivo en AcOEt con agitación a  $-78^{\circ}\text{C}$ . El exceso de bromo fue eliminado del medio de reacción reduciéndolo a bromuro con tiosulfato de sodio y extrayendo el bromuro de la fase AcOEt por lavado con agua.

##### 5.4.2 Reacción de sulfonilación

Se realizaron entonces reacciones de sulfonilación utilizando cloruro de *p*-toluensulfonilo como reactivo sulfonilante (1,0 equivalente por cada equivalente de compuesto a sulfonilar, considerando PM promedio de 300 Da) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1,4 equivalentes por cada equivalente de compuesto a sulfonilar, considerando PM promedio de 300 Da) en acetona a reflujo durante 24 horas.

Un punto particularmente importante en las reacciones de modificación de extractos es la eliminación del reactivo sulfonilante en exceso lo cual se realizó utilizando una resina captadora de *tris* (2-aminoetil) - amino poliestireno, que es selectiva al reactivo usado. Con el objetivo de estimar la cantidad de resina a utilizar se consideró que al menos el 50% del reactivo sulfonilante utilizado había reaccionado con algún producto natural presente en el extracto. Entonces el crudo de reacción de cada extracto modificado se disolvió en diclorometano (DCM), se agitó en presencia de resina (0,5 equivalentes con respecto a la cantidad inicialmente agregada de cloruro de *p*-toluen sulfonilo) se filtró y lavó con DCM y posteriormente con MeOH (previa agitación por un día). De esta

manera se generan dos fracciones a partir de cada extracto, una fracción DCM y una fracción MeOH.

#### 5.4.3 Reacción de hidracinólisis

##### **Protocolo I**

Se realizó la reacción con hidracina monohidrato ( $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1 mL) sobre cada uno de los extractos secos (300 mg), utilizando 20 mL de etanol (EtOH) absoluto como solvente de reacción. La misma fue realizada con calentamiento a reflujo durante 4 horas, luego de lo cual la hidracina en exceso se eliminó con particiones sucesivas diluyendo con agua y extrayendo con diclorometano (DCM, 30 mL), acetato de etilo (AcOEt, 30 mL), butanol (n-BuOH, 30 mL) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ , 30 mL).

##### **Protocolo II**

Se realizó la reacción con hidracina monohidrato ( $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1 mL) sobre cada uno de los extractos secos (300 mg), utilizando 20 mL de etanol (EtOH) absoluto como solvente de reacción. La misma fue realizada con calentamiento a reflujo durante 4 horas, luego de lo cual la hidracina en exceso se eliminó con particiones sucesivas diluyendo con agua y extrayendo con diclorometano (DCM, 30 mL), butanol (n-BuOH, 30 mL) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ , 30 mL).

#### 5.5 Ensayo de actividad antioxidante utilizando DPPH

##### **Solución reveladora**

Solución de DPPH (0,4 mg/mL): Se calculó 3 mL por placa de solución.

**Procedimiento general:** La solución de DPPH se roció hasta saturación sobre las placas cromatográficas. Inmediatamente después del rociado las mismas se situaron bajo corriente de aire para eliminar el etanol y evitar la desorción de los compuestos del CCD por eventuales gotas que quedaran sobre la superficie. La lectura del ensayo se realizó a los 30 minutos.

## 5.6 Comparación de cambios en las propiedades biomoleculares de los extractos

### 5.6.1 Actividad inhibitoria $\beta$ -glucosidasa

#### **Soluciones de trabajo:**

Buffer acetato de sodio 100 mM; pH 5,00: Se disolvieron 15 g de acetato de sodio en 800 mL de agua destilada, se ajustó a pH 5,00 con aproximadamente 2 mL de ácido acético glacial y se llevó a volumen con agua destilada. La solución se almacenó a 2°C.

Solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (5 % P/V): Se disolvieron 5 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de buffer de acetato de sodio (pH 5,00) 100 mM. La solución se preparó siempre momentos antes de ser utilizada.

Solución de esculina (0,2 mg/mL): Se sonicaron 160 mg de esculina hasta disolución en 80 mL de buffer de acetato de sodio (pH 5,00) 100 mM. La solución se preparó momentos antes de ser utilizada.

Solución de  $\beta$ -glucosidasa (2,5 U/mL): Se disolvieron 25 U de  $\beta$ -glucosidasa en 10 mL de buffer AcONa (pH 5,00) 100 mM. La solución se almacenó refrigerada a 2°C.

**Procedimiento general:** Se disolvieron 52,5 mg de agar a 80°C en 7,5 mL de solución de buffer acetato de sodio/ácido acético. La solución resultante se dejó enfriar hasta 45°C y a esta temperatura se agregaron 0,9 mL de solución de cloruro férrico (0,5% P/V en buffer acetato de sodio/ácido acético 0,1 M) y 25  $\mu\text{L}$  de solución de enzima (2,5 U/mL en buffer acetato de sodio/ácido acético 0,1 M) mezclando por inversión suave. La solución resultante se distribuyó uniformemente sobre toda la superficie de la placa cromatográfica. Una vez formado el gel, la placa cromatográfica se incubó durante 120 minutos a 37°C y posteriormente se sumergió en una solución conteniendo esculina (0,2 % P/V en buffer acetato 0,1 M) a 37°C durante 120 minutos. Los cambios en coloración fueron analizados visualmente.

### 5.6.2 Actividad inhibitoria acetilcolinesterasa

#### **Soluciones de trabajo:**

Buffer fosfato Tris-HCl; 50mM; pH 8,00: 6,06 g de Tris-HCl se disolvieron en 800 mL de agua destilada, se ajustó a pH 8,00 con HCl 0,1 N y se llevó a volumen de 1000 mL con agua destilada. Se almacenó a -20 °C.

Solución de acetato de naftilo (2,5 mg/mL): 7,5 mg de acetato de naftilo se disolvieron en 3 mL de etanol. La solución se preparó antes de usar.

Solución de AchE para inmovilización en gel 132 U/mL: 300 U de AChE se disolvieron en 10 mL de Tris-HCl (pH 8,00). La solución se almacenó a -20 °C.

Solución de *Fast blue B* (2,5 mg/mL): 30 mg de *Fast blue B* se disolvieron en 12 mL de agua destilada. La solución se preparó momentos antes de ser utilizada.

**Procedimiento general:** La placa fue rociada sucesivamente con 5,0 mL de una mezcla 4:1 de solución de sal *fast blue B* (2,5 mg/mL en agua destilada) y solución de acetato de 1-naftilo (2,5 mg/mL en etanol). Posteriormente, se disolvieron 87,5 mg de agar a 80 °C en 8,2 mL de solución de buffer tris (0,05 M, pH=7,80). La solución resultante se dejó enfriar hasta 45°C y a esa temperatura se agregaron 218,5 µL de solución de enzima (60 U/mL) y se mezcló por inversión suave. Dicha solución se distribuyó uniformemente sobre la placa cromatográfica seca de manera de cubrir toda la superficie. Una vez formado el gel, la placa cromatográfica fue incubada en una caja de Petri durante 20 minutos a 37°C.

### 5.6.3 Actividad inhibitoria de xantina oxidasa

#### **Soluciones de trabajo:**

Buffer fosfato (KHPO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 50 mM; pH 8,00: Se disolvieron 34,84 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 800 mL de agua destilada, el pH de la solución se ajustó a 8,00 con HCl 0,1 N y el volumen de la solución se llevó a 1000 mL con agua destilada. Se le realizó a la solución anterior una dilución 1:4 con agua destilada. La solución se almacenó a 2 °C.

Solución de EDTA (10 mM): Se disolvieron 380 mg de EDTA en 100 mL de buffer fosfato (pH 7,90) 50 mM. La solución se almacenó a 2 °C.

Solución de NBT (5,58 mg/ml): Se disolvieron 558mg de NBT en 100 mL de buffer fosfato (pH 7,90) 50 mM. La solución se almacenó en la oscuridad y refrigerada a 2°C.

Solución de xantina (1,5 mM): 22,8 mg de xantina se agregaron a 50mL de buffer fosfato (pH 8,00) 50 mM en ebullición. La mezcla se dejó en ebullición hasta disolución completa de la xantina y se diluyó con 50 mL de buffer fosfato (pH 7,90) 50 mM. La solución de xantina se preparó momentos antes de usarse.

Solución de XO (5 U/mL): Se diluyeron 27,5 µL de XO 36,4 U/mL en 200 µL de buffer fosfato (pH 8,00) 200 mM.

**Procedimiento general:** Se disolvieron 85,0 mg de agar a 80°C en una mezcla de EDTA 10 mM (0,9 mL), buffer fosfato 200 mM (2,5 mL) y agua destilada (5,0 mL). La solución resultante se dejó enfriar hasta 55°C y a esa temperatura se agregaron 0,4 mL de solución de NBT (5,58 mg/mL) y 17,5 µL de *N,N,N',N'*-Tetrametiletilendiamina. Cuando esta mezcla se alcanzó los 50°C, se agregaron 22 µL de solución de enzima (36,4 U/mL) y se mezcló por inversión suave. Posteriormente dicha solución se distribuyó uniformemente sobre la placa cromatográfica seca de manera de cubrir toda la superficie de la misma. Una vez formado el gel, la placa cromatográfica se incubó en una caja de Petri conteniendo con 30 mL de solución de xantina durante 20 minutos a 28°C

#### 5.6.4 Actividad inhibitoria de tirosinasa

##### **Soluciones de trabajo:**

Solución de enzima tirosinasa: Se suspendieron 10 mg de liofilizado de enzima (1,881 U/mg) en 10 mL de buffer fosfato 20 mM pH 6,8 y luego se llevó la solución a 10 mL con el mismo buffer (concentración final 1,881 U/mL).

Solución de L- tirosina: Se disolvieron 10 mg de L-tirosina en un volumen final de 10 mL de buffer fosfato 20 mM, pH 6,8 (Concentración final 2,5 mM).

Gel de agar: Se disolvieron 12 g de agar en un volumen final de 100 mL de buffer fosfato 20 mM de pH 6,8 (concentración final 1,2 % P/V). La solución se llevó hasta 80 °C y se dejó enfriar hasta 35°C.

**Procedimiento general:** A 7,2 mL de una solución de agar de 1,2 % P/V a 35 °C, se le agregaron 186 µL de la solución de enzima (1881 U/mL) la mezcla se homogenizó cuidadosamente por inversión. Luego se le agregan 1,8 mL de la solución de sustrato (2,5 mM). Esta solución se vertió sobre la placa cromatográfica y se llevó a 20 °C, temperatura a la que las placas son incubadas. Luego de transcurrido el tiempo de incubación (20 min) las placas fueron fotografiadas bajo luz visible.

### 5.7 Reacción de AcOEt con hidracina monohidrato

Se pusieron a reaccionar 2.5 mL de AcOEt con 30 µL de N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, a temperatura ambiente, con agitación durante 2 hs. *Work up:* se coevaporó la hidracina en exceso con volúmenes de AcOEt.

### 5.8 Determinación de Cl<sub>50</sub> de compuestos inhibidores de tirosinasa

Los ensayos de inhibición de la enzima tirosinasa se realizaron en formato de microplaca de 96 pocillos de acuerdo con el método descrito por Atta-ur-Rahman.<sup>115</sup> Los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración de 3,7 % V/V. Se preincubaron 12 unidades de enzima tirosinasa (200 µL) con los compuestos a ensayar (10 µL) en buffer de fosfato (100 mM, pH 6,8) durante 10 min a 25 °C. A continuación, 60 µL de solución de L-tirosina (1,7 mM) se añadieron a la mezcla de reacción y la reacción enzimática se monitoreó midiendo el cambio en la absorbancia a 475 nm (a 37 °C) durante 20 minutos debido a la formación del dopacromo. Los ensayos se repitieron dentro del rango de concentraciones desde 80 hasta 0,0042 µM del potencial compuesto inhibidor a evaluar. También se realizaron ensayos con las mismas diluciones en serie preparadas por dilución de solución (80 mM) del inhibidor de referencia ácido kójico. Posteriormente, el ajuste de curvas para calcular la concentración

inhibitoria media (CI50) se realizó utilizando GraphPad Prism V 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.). Todos los estudios fueron llevados a cabo al menos por triplicado y los resultados representan la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). En experimentos que requieren DMSO para disolver el inhibidor se realizaron ensayos de control empleando la mezcla de ensayo con la misma cantidad de DMSO sin inhibidor.

### **5.9 Reacción de modificación química del ácido clorogénico con hidracina monohidrato**

Se realizó la reacción con hidracina monohidrato ( $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1 mL) sobre el ácido clorogénico (51.2 mg), utilizando 15 mL de etanol (EtOH) absoluto como solvente de reacción. La misma fue realizada con calentamiento a reflujo durante 4 horas, luego de lo cual la hidracina en exceso se eliminó con particiones sucesivas diluyendo con agua y extrayendo con diclorometano (DCM, 20 mL), butanol (n-BuOH, 20 mL) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ , 20 mL).

#### **5.9.1 Fraccionamiento del clorogénico modificado f. BuOH que resultó activa frente a tirosinasa**

12 mg de la f. BuOH activa fueron sometidos a cromatografía en columna con solventes y mezclas de solventes de polaridad creciente comenzando con DCM:MeOH 99:1, para luego seguir con las siguientes proporciones de DCM:MeOH: 98:2, 97:3, 96:4, 90:10, 80:20 y 70:30, para dar 106 fracciones.

Todas las fracciones fueron evaluadas por CCD con fase móvil DCM:MeOH 80:20, para el análisis de la eficiencia de la columna y posterior reunión de las mismas, teniendo en cuenta el resultado del análisis. Se obtuvieron 5 subfracciones en orden de polaridad creciente: S1, S2, S3, S4 y S5.

### **5.9.2 Escalado de la reacción de modificación química del ácido clorogénico con hidracina monohidrato**

Se realizó la reacción con hidracina monohidrato ( $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , 1 mL) sobre el ácido clorogénico (78,2 mg), utilizando 15 mL de etanol (EtOH) absoluto como solvente de reacción. La misma fue realizada con calentamiento a reflujo durante 4 horas, luego de lo cual la hidracina en exceso se eliminó con particiones sucesivas diluyendo con agua y extrayendo con diclorometano (DCM, 20 mL), butanol (n-BuOH, 20 mL) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ , 20 mL).

### **5.9.3 Nuevas condiciones para el fraccionamiento del clorogénico modificado f. BuOH que resultó activa frente a tirosinasa.**

16.4 mg de la f. BuOH activa fueron sometidos a cromatografía en columna con solventes y mezclas de solventes de polaridad creciente comenzando con DCM 100%, haciéndola prácticamente isocrática para luego seguir con las siguientes proporciones de DCM:MeOH con el agregado de entre 1 y 2 volúmenes muertos: 99:1, 97:3, 96:4, 90:10, 80:20 y 70:30, para dar 167 fracciones.

Todas las fracciones fueron evaluadas por CCD con fase móvil DCM:MeOH 80:20, para el análisis de la eficiencia de la columna y posterior reunión de las mismas, teniendo en cuenta el resultado del análisis. Se obtuvieron 7 subfracciones en orden de polaridad creciente: CF1, CF2, CF3, CF4, CF5, CF6 y CF7.

### **5.9.4 Reacción de modificación química del ácido clorogénico con hidracina monohidrato escalado nuevo**

Se realizó la reacción con hidracina monohidrato ( $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , 50  $\mu\text{L}$ ) sobre el ácido clorogénico (104.8 mg), utilizando 6 mL de etanol (EtOH) absoluto como solvente de reacción. La misma fue realizada con calentamiento a reflujo durante 4 horas, luego de lo cual la hidracina en exceso se eliminó con particiones sucesivas diluyendo con agua y extrayendo con cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ , 20 mL), butanol (n-BuOH, 20 mL) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ , 20 mL).



#### **5.9.5 Fraccionamiento del clorogénico modificado f. BuOH que resultó activa frente a tirosinasa**

36.7 mg de la f. BuOH activa fueron sometidos a cromatografía en columna con solventes y mezclas de solventes de polaridad creciente comenzando con DCM:MeOH 99:1, para luego seguir con las siguientes proporciones de DCM:MeOH: 98:2, 97:3, 96:4, 90:10, 80:20 y 70:30, para dar 143 fracciones.

Todas las fracciones fueron evaluadas por CCD con fase móvil DCM:MeOH 80:20, para el análisis de la eficiencia de la columna y posterior reunión de las mismas, teniendo en cuenta el resultado del análisis. Se obtuvieron 8 subfracciones en orden de polaridad creciente: CL1, CL2, CL3, CL4, CL5, CL6, CL7 y CL8.

#### **5.10 Síntesis de cafeato de metilo**

600 mg cafeico se disuelven en 2 mL de MeOH, en medio ácido (50  $\mu$ L de sulfúrico), se lleva a reflujo la reacción por 2 horas. El work up de la reacción se realiza de la siguiente manera: se seca el crudo de reacción, se redissuelve en agua y se lleva a pH 9 con bicarbonato, luego se extrae con AcOEt.

##### **5.10.1 Modificación química de cafeato de metilo con hidracina monohidrato**

Se realizó la reacción con hidracina monohidrato ( $N_2H_4 \cdot H_2O$ , 75  $\mu$ L) sobre el cafeato de metilo (202.2 mg), utilizando 6 mL de etanol (EtOH) absoluto como solvente de reacción. La misma fue realizada con calentamiento a reflujo durante 4 horas, luego de lo cual la hidracina en exceso se eliminó con particiones sucesivas diluyendo con agua y extrayendo con diclorometano (DCM, 20 mL), butanol (n-BuOH, 20 mL) y agua ( $H_2O$ , 20 mL).

#### **5.11 Condiciones e instrumental para experimento de CLAE**

Las medidas de CLAE-DAD se realizaron con un equipo Infinity System 1260 (Agilent Technologies). Las condiciones fueron: temperatura de la columna: 30°C, volumen de inyección: 2  $\mu$ L, velocidad de flujo: 0.3

mL/min, fase móvil: acetonitrilo calidad HPLC (canal A) y ácido fórmico calidad HPLC 0.1% (canal B). El gradiente de elución está dado como (min)/(%) canal A: 0/30, 7/50, 10/70, 13/70, 16/80, 18/80, 20/30 y 22/30.

### **5.12 Condiciones para experimento de CLAE-EM**

Las condiciones fueron: temperatura del desolventador: 400°C, volumen de inyección: 2 µL, velocidad de flujo de Nitrógeno: 0.8 L/min, fase móvil: acetonitrilo calidad HPLC (canal A) y ácido fórmico calidad HPLC 0.1% (canal B). El gradiente de elución está dado como (min)/(%) canal A: 0/30, 7/50, 10/70, 13/70, 16/80, 18/80, 20/30 y 22/30. Voltaje del capilar: 2 kV, voltaje de la celda de colisión: 3 V.

### **5.13 Escalado y purificación de los activos mediante HPTLC e interfaz de EM**

Utilizando un equipo CAMAG TLC, se sembraron 13 calles, en cada una de ellas 100µg de cafeato de metilo modificado. Luego con el mismo equipamiento, se desarrolló la CCD utilizando fase móvil (DCM:MeOH) en proporciones (80:20), revelando bajo luz UV a 254 y 365nm. Posteriormente, se recortó una de las calles para realizar el ensayo de tirosinasa y así realizar el seguimiento bioguiado. Una vez que se detectaron en la placa las zonas de actividad, se procedió a utilizar el interfaz-MS como complemento del equipo CAMAG, para desadsorber los compuestos activos

### **5.14 Determinación de $Cl_{50}$ de compuestos inhibidores de tirosinasa**

Los ensayos de inhibición de la enzima tirosinasa se realizaron en formato de microplaca de 96 pocillos de acuerdo con el método descrito por Atta-ur-Rahman.<sup>115</sup> Los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración de 3,7 % V/V. Se preincubaron 12 unidades de enzima tirosinasa (200 µL) con los compuestos a ensayar (10 µL) en buffer de fosfato (100 mM, pH 6,8) durante 10 min a 25 °C. A continuación, 60 µL de solución de L-tirosina (1,7 mM) se añadieron a la mezcla de reacción y la reacción enzimática se monitoreó midiendo el cambio en la absorbancia a 475 nm (a 37 °C) durante 20 minutos debido a la formación del dopacromo.

Los ensayos se repitieron dentro del rango de concentraciones desde 80 hasta 0,0042  $\mu$ M del potencial compuesto inhibidor a evaluar. También se realizaron ensayos con las mismas diluciones en serie preparadas por dilución de solución (80 mM) del inhibidor de referencia ácido kójico. Posteriormente, el ajuste de curvas para calcular la concentración inhibitoria media (CI50) se realizó utilizando GraphPad Prism V 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.). Todos los estudios fueron llevados a cabo al menos por triplicado y los resultados representan la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). En experimentos que requieren DMSO para disolver el inhibidor se realizaron ensayos de control empleando la mezcla de ensayo con la misma cantidad de DMSO sin inhibidor.

#### 5.15 Reacción de Rutina y Luteolina con hidracina monohidrato

Se realizó la reacción con hidracina monohidrato ( $N_2H_4 \cdot H_2O$ , 75  $\mu$ L) sobre rutina (50.2 mg) y luteolina (30.3 mg) en sendos balones utilizando 3 mL de etanol (EtOH) absoluto como solvente de reacción en cada caso. La misma fue realizada con calentamiento a reflujo durante 4 horas, luego de lo cual la hidracina en exceso se eliminó con particiones sucesivas diluyendo con agua y extrayendo con diclorometano (DCM, 20 mL), butanol (n-BuOH, 20 mL) y agua ( $H_2O$ , 20 mL).

#### 5.16 Ensayo de inhibición de bromodominios de *Trypanosoma cruzi*

##### 5.16.1 Ensayo en microplaca

Contamos con un ensayo de atenuación de la fluorescencia en microplacas de 96 pocillos (equipo Synergy HT Microplate Reader). El fundamento del método es la modificación de la fluorescencia de triptófanos debida a la interacción de la proteína con un ligando, TcBDF3 presenta un triptofano en su bolsillo de unión al ligando acetilado. Este ensayo fue inicialmente validado con dos inhibidores de Bromodomonios previamente caracterizados (iBET-151, JQ1(+)). Brevemente, se incubó TcBDF3-HA 0,5  $\mu$ g/ml en tampón

fosfato 100 mM pH 8 con tres concentraciones crecientes de compuesto (típicamente 5; 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$ ) en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  y se evalúa la disminución en la intensidad de fluorescencia máxima al aumentar la concentración de compuesto. Como control se utiliza el inhibidor de Bromodominio iBET-151, el cual reportamos que es capaz de unirse a TcBDF3 de manera específica pero débil y tiene actividad tripanocida.

#### 5.16.2 Ensayo en epimastigotes (curva de crecimiento)

Para contar los parásitos, se diluyeron directamente en solución de PBS-formaldehído 4% y colocaron en cámara de Neubauer. Alternativamente, el crecimiento relativo se determinó utilizando un contador hematológico automatizado (W19 Counter AA de Weiner Lab) adaptado para conteo de epimastigotes. Los cultivos se consideraron en fase exponencial temprana de crecimiento cuando contenían densidades de entre  $0,5\text{-}1 \times 10^7$  parásitos/ml, en fase exponencial entre  $1\text{-}5 \times 10^7$  parásitos/ml y en fase exponencial tardía entre  $5\text{-}8 \times 10^7$  parásitos/ml. Las curvas de crecimiento fueron realizadas por triplicado contando todos los días o cada dos días.

Los compuestos se evaluarán sobre epimastigotes de la cepa de *T. cruzi* Dm28c. Se utilizarán concentraciones crecientes de compuestos con el fin de calcular la concentración inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ), utilizando como control positivo la droga tripanocida de referencia Beznidazol ( $\text{CI}_{50} \sim 8 \mu\text{M}$ ). Se graficó el logaritmo de la concentración de parásitos a los 3 días para el logaritmo de cada concentración de iBET-151 utilizada. Luego se realizó un ajuste no paramétrico de la curva para obtener el valor de concentración inhibitoria media.

#### 5.17 Reacción de Silimarinas con bromo

Se utilizó un protocolo para la modificación de extractos por bromación teniendo en cuenta directamente bromo líquido como reactivo en AcOEt con agitación a  $-78^\circ\text{C}$ . Se disolvieron 321.3 mg de silimarinas en 10 mL de AcOEt, y luego se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de bromo. El exceso de bromo fue eliminado del medio de reacción reduciéndolo a bromuro con

tiosulfato de sodio y extrayendo el bromuro de la fase AcOEt por lavado con agua.

#### **5.17.1 Fraccionamiento de Silimarinas modificadas con bromo que resultaron activas frente a inhibición de bromodominios de *T. cruzi***

389.1 mg activos fueron sometidos a cromatografía en columna con solventes y mezclas de solventes de polaridad creciente comenzando con Hex:AcOEt 70:30, para luego seguir con las siguientes proporciones de Hex:AcOEt: 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 y 10:90, para dar 55 fracciones.

#### **5.18 Reacción de Taxifolina con bromo**

Se utilizó un protocolo para la modificación de extractos por bromación teniendo en cuenta directamente bromo líquido como reactivo en AcOEt con agitación a -78°C. Se disolvieron 321.3 mg de silimarinas en 10 mL de AcOEt, y luego se agregaron 100 µL de bromo. El exceso de bromo fue eliminado del medio de reacción reduciéndolo a bromuro con tiosulfato de sodio y extrayendo el bromuro de la fase AcOEt por lavado con agua.









## **6. BIBLIOGRAFÍA**







1. Clardy, J.; Walsh, C., Lessons from natural molecules. *Nature* **2004**, 432, 829-837.
2. Sucunza, D. Inspired by Nature: Modern Drugs. *Chemistry*, **2014**, 28, 40–45.
3. Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* **2016**, 79, 629-661.
4. Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J., Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents†. *Chemical Reviews* **2009**, 109 (7), 3012-3043.
5. Harvey, A. L., Natural Products as a screening resource. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 480-484.
6. Harvey, A. L., The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery* **2015**, 1, 1-19.
7. Carter, G. T. Natural products and pharma 2011: Strategic changes spur new opportunities. *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, 28, 1783-1789.
8. Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R. y Quinn, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov*, **2015**, 14, 111-129.
9. Campos, D. S. Medicamentos, Plantas Medicinales Y Productos Naturales. *Fármacos*. **2003**, 16 (1–2), 13–20.
10. Gutiérrez Ravelo, Á., & Estévez Braun, Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el siglo XXI. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.* **2009**, 103(2), 409-419.
11. Maltese, F.; van der Kooy, F.; Verpoorte, R., Solvent derived artifacts in natural products chemistry. *Nat Prod Commun* **2009**, 4 (3), 447-54.
12. Ramallo, I. A.; Salazar, M. O.; Mendez, L.; Furlan, R. L. E., Chemically Engineered Extracts: Source of Bioactive Compounds. *Accounts of Chemical Research* **2011**, 44 (4), 241-250.

13. Ramallo, I. A. Desarrollo de herramientas para la expansión de diversidad molecular (EDM) de colecciones naturales. Tesina para optar al grado de Licenciado en Biotecnología, UNR, **2005**.
14. Lopez, S. N., Ramallo, I. A., Sierra, M. G., Zacchino, S. A. y Furlan, R. L. Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2007**, 104, 441-444.
15. Wu, T., Jiang, C., Wang, L., Morris-Natschke, S. L., Miao, H., Gu, L., Xu, J., Lee, K.-H. y Gu, Q. 3,5-diarylpyrazole derivatives obtained by ammonolysis of the total flavonoids from chrysanthemum indicum extract show potential for the treatment of alzheimer's disease. *J. Nat. Prod.*, **2015**, 78, 1593-1599.
16. Salazar, M. O., Ramallo, I. A., Micheloni, O., González Sierra, M. y Furlan, R. L. E. Chemically engineered extracts: Bioactivity alteration through sulfonylation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 5067-5070.
17. Méndez, L., Salazar, M. O., Ramallo, I. A. y Furlan, R. L. E. Brominated extracts as source of bioactive compounds. *ACS Combinatorial Science*, **2010**, 13, 200-204.
18. Ramallo, I., Gonzalez Sierra, M. y Furlan, R. Discovery of  $\beta$ -glucosidase inhibitors from a chemically engineered extract prepared through ethanolysis. *Medicinal Chemistry*, **2012**, 8, 112 - 117.
19. Kikuchi, H., Sakurai, K. y Oshima, Y. Development of diversity-enhanced extracts of curcuma zedoaria and their new sesquiterpene-like compounds. *Org. Lett.*, **2014**, 16, 1916-1919.
20. Ramallo, I. A.; Alonso, V.; Rúa, F.; Serra, E.; Furlan, R. L. E. A bioactive Trypanosoma cruzi bromodomain inhibitor from chemically engineered extracts.
21. Salazar, M. O., Micheloni, O., Escalante, A. M. y Furlan, R. L. E. Discovery of a  $\beta$ -glucosidase inhibitor from a chemically engineered extract prepared through sulfonylation. *Mol. Divers*, **2011**, 15, 713-719.

22. García, P.; Ramallo, I. A.; Salazar, M.O.; Furlan, R.L.E. Chemical diversification of essential oils, evaluation of complex mixtures and identification of a xanthine oxidase inhibitor. *RSC Adv.* **2016**, 6: 57245–57252.
23. Fenical, W.; Jensen, P. R.; Palladino, M. A.; Lam, K. S.; Lloyd, G. K.; Potts, B. C., Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17 (6), 2175-2180.
24. Shinde, P. B.; Lee, Y. M.; Dang, H. T.; Hong, J.; Lee, C.-O.; Jung, J. H., Cytotoxic bromotyrosine derivatives from a two-sponge association of *Jaspis* sp. and *Poecillastra* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, 18 (24), 6414-6418.
25. Gribble, G. W., Naturally occurring organohalogen compounds. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 141-152.
26. Gribble, G. W., The diversity of naturally occurring organobromine compounds. *Chem. Soc. Rev.* **1999**, 28, 335.
27. Iwagawa, T.; Kaneko, M.; Okamura, H.; Nakatani, M.; van Soest, R. W. M., New alkaloids from Papua New Guinean sponge *Agelas nakamurai*. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 1310-1312.
28. Zabriskie, T. E.; Klocke, J. A.; Ireland, C. M.; Marcus, A. H.; Molinski, T. F.; Faulkner, D. J.; Xu, C.; Clardy, J. C., Jaspamide, a modified peptide from *Jaspis* sponge, with insecticidal and antifungal activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 3123.
29. Rashid, M. A.; Gustafson, K. R.; Cartner, L. K.; Shigematsu, N.; Pannell, L. K.; Boyd, M. R., Microspinosamida, a new HIV-inhibitory cyclic depsipeptide from the marine sponge *Sidonops microspinosus*. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 117.
30. Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O., Novel bromopyrrole alkaloids from the sponge *Agelas dispar*. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 122-125.
31. Wagner, C.; El Omari, M.; König, G. M., Biohalogenation: Nature's way to synthesize halogenated metabolites. *J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 540-553.

32. Rodriguez, T.; Reker, D.; Schneider, P; Schneider, G. Counting on natural products for drugs design. *Nature Chemistry*, **2016**, 1, 1-11.
33. Gu, J.; Gui Y.; Chen, L.; Yuan, G.; Lu, H-Z.; Xu, X. Use of Natural Products as Chemical Library for Drug Discovery and Network Pharmacology. *PLoS ONE* 8(4): e62839. <http://doi.org.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062839> (2013).
34. Pyea, C.; Bertinb, M.; Lokeya, S.; Gerwick, W.; Liningtond, R. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2017**, 22, 5601-5606.
35. *Bioactive natural product database*, Szenzor Management Consulting Company, Budapest, (Hungary) (by Berdy): contiene 29.432 estructuras de compuestos de origen natural con actividad biológica descrita. Versión julio de **1996**.
36. Jacob, C. A scent of therapy: pharmacological implications of natural products containing redox-active sulphur atoms. *Nat. Prod. Rep.*, **2006**, 23, 851-863.
37. Carey, F. A. y Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry Vol A*; Fifth Ed., Springer, New York, **2008**, pp 650–651.
38. Palaska, E., Aytemir, M., Uzbay, I. T. y Erol, D. Synthesis and antidepressant activities of some 3,5- diphenyl-2-pyrazolines. *Eur. J. Med. Chem.*, **2001**, 36, 539-543.
39. Sosnovskikh, V. Y., Barabanov, M. A. y Sizov, A. Y. 2 polyfluoroalkylchromones part 11. Synthesis and structures of 5-hydroxy-3-(2- hydroxyaryl)-5-polyfluoroalkyl- $\Delta^2$ -pyrazolines and 3(5)-(2-hydroxyaryl)-5(3)-polyfluoroalkylpyrazoles. *Russ. Chem. Bt.*, **2002**, 51, 1280-1291.
40. Pinto, D. C. G. A., Silva, A. y Cavaleiro, J. A. S. Synthesis and molecular structure of 3-(2-benzyloxy-6-hydroxyphenyl)-5-styrylpyrazoles. Reaction of 2-styrylchromones and Hydrazine hydrate. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 10187-10200.
41. Lee, J. T. y McCubrey, J. A. BAY-43-9006 Bayer/Onyx. *Curr. Opin. Invest. Dr.*, **2003**, 4, 757-763.



42. Boldi, A. M. Combinatorial Synthesis of Natural Product-Based Libraries. Codexis, Inc., Redwood City, California, USA. **2006**, 1-368.
43. Nisbet, L.; Moore, M. Will natural products remain an important source of drug research in the future? *Curr. Op. Biotech.* **1997**, 8, 708-712.
44. Wolfender, J.L.; Ferreira Queiroz, E.; Hostettmann, K. The importance of hyphenated techniques in the discovery of new lead compounds from nature *Expert Opin. Drug Discov.* **2006**, 1(3), 237-260.
45. a) Cragg, G.; Newman, D.; Snader, K. Natural Products in Drug Discovery and Development. *J. Nat. Prod.* **2001**, 60, 52-60. b) Cragg, G.; Newman, D. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. *Pure Appl. Chem.* **2005**, 77, 7-24.
46. Quezada, N.; Asencio, M.; Del Valle, J. M.; Aguilera, J. M.; Gómez, B. Antioxidant Activity of Crude Extract, Alkaloid Fraction, and Flavonoid Fraction from Boldo (*Peumus boldus* Molina) Leaves. *Food Chemistry and Toxicology*, **2004**, 69, 371-376.
47. Fernandez, J., Lagos, P., Rivera, P. & Zamorano-Ponce, E. Effect of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion on lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver. *Phytotherapy Research*, **2009**, 23(7), 1024-1027.
48. Freitag, A.; Cardia, G.; Ambrósio da Rocha, B.; Pazzinatto Aguiar, R.; Silva-Comar, M. Hepatoprotective Effect of Silymarin (*Silybum marianum*) on Hepatotoxicity Induced by Acetaminophen in Spontaneously Hypertensive Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2015**, 1, 1-8.
49. Shaker, E.; Mahmouda, H.; Mnaab, S. Silymarin, the antioxidant component and *Silybum marianum* extracts prevent liver damage. *Food and Chemical Toxicology*, **2010**, 48, 803-806.
50. Albino de Almeida, A.; Sánchez-Hidalgo, M.; Martín, A.; Luiz-Ferreira, A.; Trigo, J.; Vilegas, W. Anti-inflammatory intestinal activity of *Arctium lappa* L. (Asteraceae) in TNBS colitis model. *Journal of Ethnopharmacology*, **2013**, 146, 300-310.

51. Carlotto, J.; De Souza, L.; Baggio, C.; Werner, M. Polysaccharides from *Arctium lappa* L.: Chemical structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2016**, 91, 954-960.
52. Jiang, X-W.; Bai, J-P.; Zhang, Q.; Hu, X-L.; Tian, X.; Zhu, J.; Liu, J.; Meng, W-H.; Zhao, Q-C. Caffeoylquinic acid derivatives from the roots of *Arctium lappa* L. (burdock) and their structure–activity relationships (SARs) of free radical scavenging activities. *Phytochem. Lett.* **2016**, 15, 159–163.
53. Schütz, K.; Kammerer, D.; Carle, R.; Schieber, A. Identification and Quantification of Caffeoylquinic Acids and Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Heads, Juice, and Pomace by HPLC-DAD-ESI/MSn. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52 (13), 4090–4096.
54. Salem, M.; Affes, H.; Ksouda, K.; Dhouibi, R.; Sahnoun, Z.; Hammami, Z.; Zeghal, K. Pharmacological Studies of Artichoke Leaf Extract and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, **2015**, 70, 441-453.
55. Colak, E.; Ustuner, M.; Tekin, N.; Colak, Er.; Burukoglu, D.; Degirmenci, I.; Gunes, H. The hepatocurative effects of *Cynara scolymus* L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced oxidative stress and hepatic injury in rats. *Springer Plus*, **2016**, 5, 1-9.
56. Bundi, R., Walker, A.F., Middleton, R.W., Wallis, C., Simpson, H. Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: A randomized, double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine*, **2008**, 15, 668-675.
57. Kollia, E.; Markaki, P.; Zoumpoulakis, P.; Proestos, C. Antioxidant activity of *Cynara scolymus* L. and *Cynara cardunculus* L. extracts obtained by different extraction technique. *Natural Products Research*, **2017**, 31, 1163-1167.
58. Wolfender, J. L.; Marti, G.; Thomas, A.; Bertrand, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, **2015**, 1382, 136-164.

59. Wagner, H.; Bladt, S. Plant Drug Analysis. A Thin Chromatography Atlas. Springer-Verlag Berlin, **2013**.
60. Wolfender, J.L. HPLC in Natural Product Analysis The Detection Issue. *Planta Med.*, **2009**, 75, 719-734.
61. Ertas, A.; Boga, M.; Yilmaz, M.A.; Yesil, Y.; Hasimi, N.; Kaya, M. S.; Temel, H.; Kolak, U. Chemical compositions by using LC–MS/MS and GC–MS and biological activities of *Sedum sediforme* (Jacq.) Pau. *J Agric Food Chem.* **2014**, 62:4601–4609.
62. Choi, Y. H.; Kim, H. K.; Hazekamp, A.; Erkelens, C.; Lefeber, A.W.M.; Verpoorte, R. Metabolomic Differentiation of Cannabis sativa Cultivars Using <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis. *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 953-957.
63. Pyrzynska, K.; Pękala, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, **2013**, 5, 4288-4295.
64. Nostro, A.; Germanò, M.P.; D'Angelo, V., Marino, A.; Cannatelli, M.A. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* **2000**, 30, 379.
65. Vasques da Silva, R.; Navickiene, H.M.D.; Kato, M.J.; Bolzani, V.S.; Meda, C.I.; Young, M.C.M.; Furlan, M. Antifungal amides from *Piper arboretum* and *Piper turbeculatum*. *Phytochemistry*, **2002**, 59, 521-527.
66. Woodward, J.; Wiseman, A. Fungal and other  $\beta$ -d-glucosidases—their properties and applications. *Enzyme Microb. Technol.* **1982**, 4(2), 73-79.
67. Lillielund, V. H.; Jensen, H. H.; Liang, X.; Bols, M. Recent developments of transition-state analogue glycosidase inhibitors of non-natural product origin. *Chem. Rev.* **2002**, 102(2), 515-554.
68. Calatrava-Pérez, E.; Bright, S; Achermann, S; Moylan, C; Senge, M; Veale, E.; Williams, C.; Gunnlaugsson, T.; Scanlan, E. Glycosidase Activated Release of Fluorescent 1,8-Naphthalimide Probes for Tumor Cell Imaging from Glycosylated 'Pro-probes'. *Chem. Comm.*, **2013**, 00, 1-4.

69. Guo, Z.; Niu, X.; Xiao, T.; Lu, Y.; Wei Li; Zhao, Y. Chemical profile and inhibition of  $\alpha$ -glycosidase and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) activities by flavonoids from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Jornal of Functional Foods*, **2015**, 14, 324-336.
70. De Clercq, E. Ebola virus (EBOV) infection: Therapeutic strategies. *Biochemical Pharmacology.*, **2015**, 93 (1), 1-10.
71. Liu, R; Xu, B. Inhibitory Effects of Phenolics and Saponins From Commonly Consumed Food Legumes in China Against Digestive Enzymes Pancreatic Lipase and  $\alpha$ -Glycosidase. *International Journal of Food Properties*, **2015**, 18, 2246-2255.
72. Choi, E-Y.; Baker, E.; Kaler, S. Choroid plexus-directed viral gene therapy for  $\alpha$ -mannosidosis, a prototypical lysosomal disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, **2015**, 114 (2), 1-31.
73. Salazar, M. O.; Furlan, R. L. E., A Rapid CCD Autographic Method for the detection of Glucosidase Inhibitors. *Phytochem. Anal.* **2007**, 18, 209-212.
74. Pohanka, M. Inhibitors of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Meet Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15(6), 9809-9825.
75. Sadiq, A.; Mahmood, F.; Ullah, F.; Ayaz, M.; Ahmad, S.; Haq, U.; Khan, G.; Jan, M. Synthesis, anticholinesterase and antioxidant potentials of ketoesters derivatives of succinimides: a possible role in the management of Alzheimer's. *Chemistry Central Journal* **2015**, 9, 1-31.
76. Rhee, I. K.; Van de Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R., Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chrom. A* **2001**, 915, 217-223.
77. Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K., A rapid CCD bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem. Anal.* **2002**, 13, 51–54.

78. Glantzounis, G. K.; Tsimoyiannis, E. C.; Kappas, A. M.; Galaris, D. A. Uric Acid and Oxidative Stress. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11* (32), 4145–4151.
79. Battelli, M. G.; Polito, L.; Bolognesi, A. Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: not only oxidative stress. *Atherosclerosis*, **2014**, *237*(2), 562-567.
80. Granger, D. N.; Kvietys, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. *Redox Biol.* **2015**, *6*, 524-551.
81. Ojha, R.; Singh, J.; Ojha, A.; Singh, H.; Sharma, S.; Nepali, K. An updated patent review: xanthine oxidase inhibitors for the treatment of hyperuricemia and gout (2011-2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, *27*(3), 311-345.
82. Ramallo, I. A.; Zacchino, S. A.; Furlan, R. L. E., A Rapid CCD Autographic Method for the Detection of Xanthine Oxidase Inhibitors and Superoxide Scavengers. *Phytochem. Anal.* **2006**, *17*, 15-19.
83. Sánchez-Ferrer, Á. R.-L. J. N.; García-Cánovas, F. and García-Carmona, F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1247*, 1–11.
84. Smith, F.; Meyskens, F. Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 1264–1274.
85. Ilkay, E.; Mahmud, T. Flavonoid Derivatives As Potent Tyrosinase Inhibitors – A Survey of Recent Findings Between 2008-2013. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2014**, *14* (12), 1486-1493.
86. Ma, D. ; Tu, Z.; Wang, H.; Zhang, L.; He, N.; McClements, D. Mechanism and kinetics of tyrosinase inhibition by glycolic acid: a study using conventional spectroscopy methods and hydrogen/deuterium exchange coupling with mass spectrometry. *Food Funct.*, **2017**, *8*, 122-131.
87. García, P.; Furlan, R.L.E. Multiresponse Optimisation Applied to the Development of a CCD Autography for the Detection of Tyrosinase Inhibitors. *Phytochemical Analysis*, **2015**, *26*, 287-292.

88. Tarleton, R. L. Chagas Disease: A Solvable Problem, Ignored. *Trends Mol. Med.* **2016**, 22(10), 835-838.
89. Viotti, R.; Vigliano, C.; Lococo, B.; Alvarez, M. G.; Petti, M.; Bertocchi, G.; Armenti, A. Side Effects of Benznidazole as Treatment in Chronic Chagas Disease: Fears and Realities. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2009**, 7(2), 157–163.
90. Chatelain, E. Chagas Disease Research and Development: Is There Light at the End of the Tunnel. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2017**, 15, 98–103.
91. Alonso, V. L.; Ritagliati, C.; Cribb, P.; Cricco, J.; Serra, E. Overexpression of Bromodomain Factor 3 in *Trypanosoma Cruzi* (TcBDF3) Affects Parasite Differentiation and Protects It against Bromodomain Inhibitors. *FEBS J.* **2016**, 283(11), 2051–2066.
92. López, S.N.: Búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, **2005**, UNR.
93. Ramallo, I.A.: Reciclado de extractos naturales por modificación de los grupos carbonilo. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, **2010**, UNR.
94. Salazar, M.O.: Alteración de la diversidad molecular de extractos naturales: reacción de sulfonilación. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, **2010**, UNR.
95. Bhaskar, R. K. Side Effects and Biochemical Changes in Rat Liver on Drug Treatment. *International Journal of Science and Research*, **2016**, 5(2), 1881-1886.
96. Ferreira, A.; Haminiuk, C.; Nogueira, A.; Demiate, I.; Granato, D. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Food Research International*, **2014**, 60, 246-254.
97. Qin, K; Wang, B.; Li, W.; Cai, H.; Chen, D; Liu, X; Yin, F; Cai, B. Quality assessment of raw and processed *Arctium lappa* L. through multicomponent quantification, chromatographic fingerprint, and related chemometric analysis. *J. Sep. Sci.*, **2015**, 38, 1491–1498.

98. Magielse, J.; Verlaet, A; Breynaert, A; Keenoy, B.; Apers, S.; Pieters, L.; Hermans, N. Investigation of the in vivo antioxidative activity of *Cynara scolymus* (artichoke) leaf extract in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2014**, 58, 211–215.
99. Jeszka-Skowron, M.; Zgoła-Grześkowiak, A. Analysis of Antioxidant Activity, Chlorogenic Acid, and Rutin Content of *Camellia sinensis* Infusions Using Response Surface Methodology Optimization. *Food Analytical Methods*, **2014**, 7(10), 2033-2041.
100. Shin, H.; Satsu, H.; Bae, M.; Zhao, Z.; Ogiwara, H.; Totsuka, M.; Shimizu, M. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chemistry*, **2015**, 168, 167-175.
101. Kremr, D.; Bajer, T; Bajerová, P.; Surmová, S.; Ventura, K. Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: a review. *Quim. Nova*, **2016**, 39, 530-533.
102. Suárez-Quiroz, M.; Campos, A; Alfaro, G.; González-Ríos, O.; Villeneuve, P.; Figueroa-Espinoza, M. Isolation of green coffee chlorogenic acids using activated carbón. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2014**, 33(1), 55-58.
103. Wu, T; Jiang, C.; Morris-Natschke, S.; Miao, H.; Gu, L.; Xu, J; Lee, K; Gu, Q., 3,5-Diarylpyrazole Derivatives Obtained by Ammonolysis of the Total Flavonoids from *Chrysanthemum indicum* Extract Show Potential for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Nat. Prod.* **2015**, 78 (7), 1593-9.
104. Al-Ajely, M.; Yaseen, A. Synthesis of Oxo Benzotriazino Acetic, Benzimidizolyl Hydrazides and Some of Their Hydrazones. *Chemistry Journal*, **2016**, 6(1), 18-23
105. López, S.N.; Ramallo, I.A.; González Sierra, M.; Zacchino, S.A. and Furlan, R.L.E., Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2007**, 104, 441-444.

106. Winterton, S.; Ready, J. [3 + 2]-Cycloadditions of Azomethine Imines and Ynolates. *Org. Lett.*, **2016**, 18 (11), 2608–2611.
107. Claramunt, R. M., Elguero, J. The chemistry of pirazolidinones. A review. *Organic Preparations and Procedures International*, **1993**, 3, 273-320.
108. Sova, M. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. *Medicinal Chemistry*, **2012**, 12, 749-767.
109. Holser, R.; Mitchell, T.; Harry-O'kuru R.; Vaughn S.; Walter E. y Himmelsbach D. Preparation and Characterization of 4-Methoxy Cinnamoyl Glycerol. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2008**, 85(4), 347-351.
110. Alonso V. L.; Serra, E. C., Lysine acetylation: elucidating the components of and emerging global signaling pathway in Trypanosomes. *J. Biomed Biotechnol.* **2012**, 1, 1-16.
111. Alonso V. L.; Villanova G. V; Ritagliati C.; Machado Motta M. C.; Cribb, P.; Serra, E. C., *Trypanosoma cruzi* Bromodomain Factor 3 (TcBDF3) binds acetylated  $\alpha$ -tubulin and the concentrates in the flagellum during metacyclogenesis. *Eukaryotic Cell*, **2014**, 13 (6), 822-31.
112. Alonso, V. L.; Ritagliati, C.; Cribb, P.; Cricco J. A.; Serra, E. C, Overexpression of bromodomain factor 3 in *Trypanosoma cruzi* (TcBDF3) affects differentiation of the parasite and protects it against bromodomain inhibitors. *Feder. Of Europ. Biochem. Soc.*, **2016**, 1, 1-16.
113. Martinelli, T.; Whittaker, A.; Benedettelli, S; Carboni, A.; Andrzejewska, J. The study of flavonolignan association patterns in fruits of diverging *Silybum marianum* (L.) Gaertn. chemotypes provides new insights into the silymarin biosynthetic pathway. *Phytochemistry*, **2017**, 144, 9-18.
114. Schiavone, A.; Righi, F.; Quarantelli, A.; Bruni, R.; Serventi, P.; Fusari, A. Use of *Silybum marianum* fruit extract in broiler chicken nutrition: influence on performance and meat quality. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **2007**, 256-261.



115. Atta-ur-Rahman, Choudhary, I. y Thomsen, W. J. Enzyme assays. Bioassay techniques for drug development, Taylor & Francis, **2001** pp 128-130.